

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Lucie Petrželková**

**Vývoj cirkadiánního systému potkana v podmínkách stálého světla**  
**Development of the rat circadian system under constant light conditions**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22. 4. 2021

Lucie Petrželková

**Poděkování:**

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D., za vedení, odborné rady, vstřícnost a ochotu při zpracování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala všem členům laboratoře biorytmů PřF UK za pomoc při experimentech a to především Mgr. Veronice Spišské a Mgr. Anetě Kubištové.

## **Abstrakt**

Cirkadiální systém je mechanismus určený ke generování cirkadiálního času a jeho synchronizaci se solárním cyklem. Jeho funkcí je seřizovat behaviorální a fyziologické funkce s 24 hodinovou periodou. Seřizování probíhá pomocí tzv. *zeitgeberu* neboli synchronizátoru. Hlavní cirkadiální hodiny se nacházejí v suprachiasmatických jádrech (SCN) v hypothalamu. Dlouhodobé vystavení organismu podmínkám stálého světla má za následek desynchronizaci cirkadiálních hodin, což může vést k nemálo patologiím. Důsledky nočního světla na organismus jsou studovány již delší dobu, méně je však studována otázka vlivu stálého světla na vývoj cirkadiálního systému organismu. Právě této problematice se věnuje má diplomová práce. Pomocí RT-qPCR jsem zjišťovala, jak se změní rytmus v expresi vybraných hodinových genů ve vybraných částech mozku potkana, který byl od narození chován na stálém světle. Dále jsem testovala, jaký vliv má expozice stálému světle v časném vývoji rytmu v lokomoční aktivitě v pozdější fázi života potkana.

**Klíčová slova:** cirkadiální systém, světelná synchronizace, desynchronizace stálým světlem, vývoj, potkan

## **Abstract**

The circadian system is a mechanism designed to generate circadian time and to synchronize it with the solar cycle. Its function is to adjust to behavioral and physiological function with the 24-hour period. The adjustment is performed using a so-called *zeitgeber* or synchronizer. The main circadian clock is in the suprachiasmatic nuclei (SCN) in the hypothalamus.

Prolonged exposure of the organism to constant light conditions results in desynchronization of the circadian clock, which can lead to many pathologies. The impact of light at night on the organism has been studied for a long time, but the question of the impact of constant light on the development of the circadian system of the organism has been less studied. My thesis deals with this issue. Using RT-qPCR I investigated how the rhythm changes in the expression of selected clock genes in selected parts of the rat's brain, which has been kept in constant light since birth. I also tested the impact of exposure to constant light on the early development of rhythm in locomotor activity later in the rat's life.

**Keywords:** circadian system, photic entrainment, desynchronization under constant light, development, rat

# OBSAH

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>3</b>
2.1. CIRKADIÁNNÍ SYSTÉM.....	3
2.1.1. <i>Molekulární mechanismus</i> .....	3
2.1.2. <i>Centrální cirkadiánní hodiny</i> .....	6
2.1.3. <i>Synchronizační cesty ze sítnice k SCN</i> .....	8
2.1.4. <i>Sítnice a buňky ipRGC</i> .....	9
2.2. SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU.....	9
2.2.1. <i>Synchronizace světlem – molekulární podstata</i> .....	11
2.2.2. <i>Synchronizace periferních hodin světlem</i> .....	11
2.2.3. <i>Cirkadiánní systém ve strukturách mozku</i> .....	12
2.3. NMDA A JEHO PODJEDNOTKY.....	13
2.4. STÁLÉ SVĚTLO.....	14
2.4.1. <i>Úroveň světelného znečištění</i> .....	14
2.4.2. <i>Vliv stálého světla na organismus</i> .....	16
2.4.3. <i>Vliv sníženého světelného kontrastu mezi dnem a nocí na organismus</i> .....	16
2.4.4. <i>Lidé a elektronická zařízení</i> .....	17
2.5. VÝVOJ CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU.....	18
2.5.1. <i>Význam SCN matky pro vývoj cirkadiánního systému mláďat</i> .....	18
2.5.2. <i>Vývoj sítnice oka</i> .....	19
2.5.3. <i>Stálé světlo během kritické fotoperiody</i> .....	19
2.6. ÚČINEK SVĚTLA NA VÝVOJ RYTMU LOKOMOČNÍ AKTIVITY.....	20
<b>3. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>23</b>
4.1. CHEMIKÁLIE.....	23
4.2. LABORATORNÍ ZVÍŘATA.....	23
4.3. ODBĚR TKÁNÍ.....	24
4.4. IZOLACE TKÁNÍ.....	24
4.5. REVERSNÍ TRANSKRIPCE.....	25
4.6. KVANTITATIVNÍ RT-QPCR.....	26
4.7. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT CIRKADIÁNNÍ GENOVÉ EXPRESE.....	27
4.8. ZÁZNAM POHYBOVÉ AKTIVITY.....	28
4.9. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT LOKOMOČNÍ AKTIVITY.....	28
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>29</b>
5.1. VÝSLEDKY MĚŘENÍ CIRKADIÁNNÍCH RYTMŮ EXPRESE.....	29
5.1.1. <i>Expresí genů v SCN</i> .....	29
5.1.2. <i>Expresí genů v hipokampu</i> .....	32
5.1.3. <i>Expresí genů ve frontálním kortexu</i> .....	35
5.1.4. <i>Expresí genů v sítnici</i> .....	38
5.2. VÝSLEDKY ZÁZNAMU RYTMU LOKOMOČNÍ AKTIVITY.....	43
<b>6. DISKUZE.....</b>	<b>44</b>
6.1. VLIV STÁLÉHO SVĚTLA NA CIRKADIÁNNÍ RYTMY EXPRESE ZKOUMANÝCH GENŮ.....	44
6.1.1. <i>Vliv stálého světla na cirkadiánní rytmy exprese zkoumaných genů v SCN</i> .....	44
6.1.2. <i>Vliv stálého světla na cirkadiánní rytmy exprese zkoumaných genů v hipokampu</i> .....	47
6.1.3. <i>Vliv stálého světla na cirkadiánní rytmy exprese zkoumaných genů ve frontálním kortexu</i> .....	49
6.1.4. <i>Vliv stálého světla na cirkadiánní rytmy exprese zkoumaných genů v sítnici</i> .....	50
6.2. VLIV STÁLÉHO SVĚTLA NA LOKOMOČNÍ AKTIVITU DOSPĚLÝCH POTKANŮ.....	54
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>55</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>57</b>

## Seznam použitých zkratek

<i>Aanat</i>	Akrylamin-N-acetyltransferáza
ANOVA	Analýza variance/rozptylu
AVP	Arginin vazopresin
BDNF	Brain-derived neurothropic factor
bHLH	Basic helix-loop-helix
BMAL1	Brain and muscle arnt-like protein 1
cAMP	Cyklický adenosit 3', 5' monofosfát
CCGs	Hodinami řízené geny ( <i>Clock controlled genes</i> )
CKI	Kaseinová kináza
CLOCK	Circadian locomotor output cycle kaput
CREB	cAMP response element-binding protein
CRY	Cryptochrome
CT	Cirkadiánní čas ( <i>circadian time</i> )
DD	Dark/Dark světelné podmínky (24 hodin tma)
E-box	Enhancer box
GABA	Kyselina gama-aminomáselná
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrigenáza
GluN	Podjednotka NMDA receptoru
GMP	Guanylát monofosfát
<i>Grin</i>	Gen pro podjednotku NMDA receptoru
IML	Intermediální sloupce míchy
ipRGC	Fotosenzitivní gangliové buňky sítnice
LD	Light/Dark světelné podmínky (12 hodin světlo, 12 hodin tma)
LL	Light/Light světelné podmínky (24 hodin světlo)
LTP	Dlouhodobá potenciace
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
<i>Nr1dl</i>	Gen pro jaderný receptor rodiny 1, skupiny D, člen 1
<i>Opn</i>	Opsin
P	Hodnota, která udává míru významnosti rozdílu mezi zkoumanými skupinami
P1,10,20	Postnatální den 1, 10, 20
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAS	Akronym názvů Period/Arnt/Single-minded
PER	Period
PRC	Fázově responzní křivka ( <i>Phase response curve</i> )
PVN	Paraventriculární jádro hypotalamu
<i>Rev-erb</i>	Reverse strand of ERBA
<i>Rho</i>	Rodopsin
RHT	Retnohypotalamický trakt
ROR	Retinoic acid-related orphan receptor
RT-q PCR	Real-time kvantitativní polymerázová řetězová reakce

SCG	Superirní cervikální ganglia sympatiku
SCN (VL a DM)	Suprachiasmatická jádra (ventrolaterální a dorsomediální)
SEM	Střední chyba průměru
<i>Stat3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3
VIP	Vasoaktivní intestinální peptid

# 1. Úvod

Cirkadiánní systém je fyziologický mechanismus pro sledování času. Seřizuje fyziologické a behaviorální funkce s 24 hodinovou periodou. Každodenní změny v přírodě jsou předvídatelné právě díky cirkadiánním hodinám, což dává organismům výhodu přežití. Tento mechanismus se vyvinul již u jednobuněčných organismů a fakt, že dochoval ve většině forem života až do současnosti, dokazuje důležitost časové organizace pro životní funkce.

Hlavní cirkadiánní hodiny se nachází v suprachiasmatických jádrech hypotalamu (SCN). Jde o párovou strukturu, která leží nad překřížením optických nervů. Tato struktura je zcela zásadní pro synchronizaci periferních hodin, které se nacházejí například v plicích, játrech a jiných orgánech. Tyto periferní hodiny sice dokáží do jisté míry pracovat samostatně, ale nedokáží se synchronizovat vzájemně a také s fází solárního cyklu, a právě to je funkcí SCN.

Synchronizace vnějšími vlivy je nezbytná pro správné fungování cirkadiánních hodin. Bez této synchronizace běží hodiny pouze s přibližně 24 hodinou periodou. Kdyby nedocházelo k této synchronizaci, docházelo by buď ke zpoždování cirkadiánních hodin, nebo naopak k jejich předbírání. Mezi vnější vlivy, které dokáží systém takto synchronizovat, patří především střídání světla a tmy během dne a noci. Dále to může být časovaný příjem potravy či sociální interakce.

Právě střídání světla a tmy je zásadní pro správné fungování cirkadiánních hodin. Velký světelný kontrast mezi dnem a nocí, tzn. dostatečná tma v noci, hodně světla přes den je považováno za tzv. silný synchronizátor, který zajišťuje správnou funkci cirkadiánního systému. Tohoto stavu však může být v dnešní době problém dosáhnout. Lidé tráví den v uzavřených budovách, kde je přirozeného světla mnohem méně, než které by získali venku ze Slunce. Večery pak tráví u televize či s mobilním telefonem v ruce a světla mají naopak více než by měli mít. Přidáme-li k tomu ještě celkový světelný smog, dochází k tomu, že kontrast mezi dnem a nocí není již tak velký, aby zajišťoval správnou synchronizaci cirkadiánního systému se solárním cyklem.

Efekt stálého světla na dospělý organismus a především důsledky desynchronizace cirkadiánního systému, které z toho plynou, jsou intenzivně zkoumány. Méně prozkoumaný je vliv stálého světla na vývoj organismu. Již je známo, že stálé světlo má rozdílný efekt u dospělého a vyvíjejícího organismu. Má diplomová práce se zaměřuje právě na vliv stálého světla na vývoj cirkadiánního systému mladého potkana v časném postnatálním vývoji. V této diplomové práci jsem se zaměřila na vliv stálého světla na rytmickou genovou expresi v mozku a v sítnici. Stálé světlo není problém pouze pro člověka, ale právě díky světelnému smogu se



tento problém týká i živočichů ve volné přírodě, proto mohou mít naše výsledky velký význam nejen pro člověka, ale právě i pro živočichy.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Cirkadiánní systém

Cirkadiánní systém se skládá z centrálních hodin, které se nacházejí v SCN, ze vstupních a výstupních drah a z periferních hodin, které se nacházejí v různých tělních tkáních. Periferní hodiny jsou autonomní, ale ke vzájemné synchronizaci potřebují hlavní hodiny v SCN.

Cirkadiánní oscilace mají sice genetickou podstatu, molekulární mechanismus ale nedokáže zajistit přesně 24 hodinou periodu. K tomu je nezbytná synchronizace vnitřního rytmu s vnějším solárním cyklem. Odchyłka mezi vnitřní periodou a periodou solárního cyklu musí být denně vyrovnávána. Kdyby k tomuto nedocházelo, začátek vnitřní periody by se neustále oddaloval od začátku solárního dne a cirkadiánní hodiny by běžely tzv. volným během. Hodiny by tedy nedávaly dostatečně jasnou časovou informaci periferním hodinám, docházelo by tak k desynchronizaci a k nesouladu v časování fyziologických procesů v orgánových soustavách. Vnější synchronizátor, který se nazývá *Zeitgeber*, tedy upravuje délku periody, ale také fázi vnitřního oscilátoru. Na vnitřní, neboli endogenní, periodě daného organismu závisí délka subjektivního dne a subjektivní noci, o kterých mluvíme v případě, že studujeme cirkadiánní systém v izolaci od vnějšího času. Délka subjektivního dne a noci není stejná jako délka „objektivního“, tj. solárního dne a noci, a je závislá na délce endogenní periody.

#### 2.1.1. Molekulární mechanismus

Cirkadiánní hodiny běží i v neperiodickém prostředí se svojí vnitřní endogenní periodou (*tau*), která je dlouhá zhruba 24 hodin v závislosti na druhu organismus (potkan 24,4 hodin, člověk 24,5 hodin). To svědčí o jejich genetickém základu, který je tvořen molekulárním zpětnovazebným mechanismem. Hlavní podstatou molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin jsou vzájemné interakce pozitivní a negativní transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky hodinových genů.

Primární smyčka se skládá z pozitivních a negativních transkripčních elementů. Protein CLOCK (z anglického „*circadian locomotor output cycle kaput*“) a protein BMAL1 (z anglického „*Brain and muscle arnt-like protein1*“) patří mezi pozitivní elementy primární zpětnovazebné smyčky. Tyto proteiny lze zařadit mezi bHLH-PAS (basic helix-loop-helix – Period/Arnt/Single-minded) transkripční faktory. Tyto transkripční faktory spolu dimerizují pomocí PAS domény. Dochází tak ke vzniku heterodimeru CLOCK:BMAL1. Tento heterodimer se pomocí DNA vazebné domény bHLH váže na sekvenci CACGTG, tzv. Enhancer box (E-box) v promotorech *Period* (*Per1, 2, 3*) a *Cryptochrom* (*Cry1, Cry2*). Tímto

navázáním se aktivuje jejich transkripci (Gekakis *et al.*, 1998). Proteiny genů *Period* a *Cryptochrom* se kumulují v cytoplazmě, kde jsou fosforylovány kaseinovými kinázami  $\epsilon$  a  $\delta$  (CKI $\epsilon$  a CKI $\delta$ ), a poté ubiquitizovány ligázovým komplexem nebo vstupují do jádra.

Proteiny PER a CRY spolu tvoří heterodimer a zastávají funkci represorů. Vrací se do jádra, kde tento komplex vyvazuje CLOCK:BMAL1 od DNA a tím zabraňuje svojí vlastní transkripci (obrázek č. 1). Když dojde v buňce ke snížení hladiny PER a CRY, tak nic nebrání komplexu CLOCK:BMAL1 začít další transkripci. Proces tak začíná znova (Kume *et al.*, 1999). Celý proces trvá přibližně 24 hodin. Fosforylace je významná i pro komplex CLOCK:BMAL1; heterodimer s BMAL1 je schopen tvořit jak fosforylovaný, tak nefosforylovaný CLOCK. Ale pouze fosforylovaný CLOCK je schopen integrovat s proteiny PER a CRY (Lee *et al.*, 2001).

Dále se v molekulárním mechanismu cirkadiálního systému nachází sekundární smyčka, což je smyčka sloužící k regulaci hodinového genu *Bmal1*. Tato smyčka zajišťuje jeho dostupnost pro základní pozitivní komponentu CLOCK:BMAL1. Při transkripci hodinového genu *Bmal1* mají zásadní úlohu dva jaderné receptory – REV-ERB $\alpha$  a ROR $\alpha$ . Rodina REV-Erb potlačuje transkripci *Bmal1* a to vedek k prodloužení periody, ROR rodina transkripci naopak aktivuje, to tedy vede ke zkrácení cirkadiální periody (obrázek č. 1).

Komplex CLOCK:BMAL1 v neposlední řadě nasedá na E-boxy tzv. hodinami kontrolovaných genů (CCGs, z anglického „clock controlled genes“). Tím umožňuje regulaci cirkadiálních rytmů mnoha fyziologických procesů v organismu. Produkty těchto genů však nejsou součástí zpětnovazebných smyček. To znamená, že tyto produkty nejsou nezbytné pro fungování cirkadiálních hodin. Tyto geny obvykle kódují funkční proteiny, které se účastní biologických procesů. Takto se rytmický signál přenáší na řízení různých fyziologických funkcí. CCGs jsou tedy zodpovědné za pozorovatelné výstupní rytmy. Mezi CCGs patří například neurotransmitter arginin vasopresin (AVP) nebo třeba geny účastníci se kontroly řízení buněčného dělení – *c-Myc* a *p53*.

Existence hodinových genů u savců byla objevena v 90. letech minulého století. U savců se nacházejí tři homologní geny *Period* – *Per1*, *Per2* a *Per3*. Geny *Per1* a *Per2* hrají roli ve světelné synchronizaci cirkadiálního systému a oba geny jsou indukovatelné světlem v hlavním cirkadiálním pacemakeru v SCN. V roce 1999 bylo pozorováno, že *Per1* je nezbytný pro fázový posun rytmu v lokomoční aktivitě vyvolaný světelným pulzem (Akiyama *et al.*, 1999). O dva roky později, ve studii Albrecht a spol. (2001) bylo zjištěno, že myši s mutací v genu *Per1* a *Per2* nereagují fázovými změnami na světelné stimulační. Geny *Per* jsou tedy složkami cirkadiálního systému, které podléhají regulaci dimerem CLOCK/BMAL1, ale reagující také na světlo, a podílejí se tak na nastavování cirkadiálních hodin fází solárního cyklu (Albrecht *et al.*, 2001).

Cirkadiánní oscilace v expresi *Per1* mají v SCN maximum přibližně v polovině dne, nebo v cirkadiánním čase (CT) 4-6, tj. 4-6 hodin po začátku subjektivního dne, pokud sledujeme rytmus probíhající ve stálé tmě. Rytmus exprese *Per2* je za expresí *Per1* opožděn a má maximum až v CT8. Exprese *Per3* dosahuje maximálních hodnot v hladině mRNA v rozmezí CT4-8 (S. M. Reppert and Weaver, 2001).

Geny *Cryptochrome* jsou hlavními negativními elementy zpětnovazebné smyčky. U savců byly identifikovány dva homology – *Cry1* a *Cry2*. Oba tyto geny jsou exprimovány v SCN, rozdíl je v tom, že pouze *Cry1* vykazuje cirkadiánní oscilace. Hladina mRNA genu *Cry1* má maximum v CT0 – tedy na úplném začátku subjektivního dne (S. M. Reppert and Weaver, 2001). Proteiny CRY jsou dále zásadní pro stabilitu fosforylovaných proteinů PER2 (Lee *et al.*, 2001), což je důležité pro udržování periody cirkadiánních hodin. Tato stabilita je dána tím, že interakce PER:CRY je chrání před ubiquitinilací a následnou degradací. Delece *Cry1* vede ke zkrácení periody rytmu, naopak delece *Cry2* vede k prodloužení periody rytmu. Mutace v obou genech vede k celkové ztrátě cirkadiánní rytmicity (Kume *et al.*, 1999).

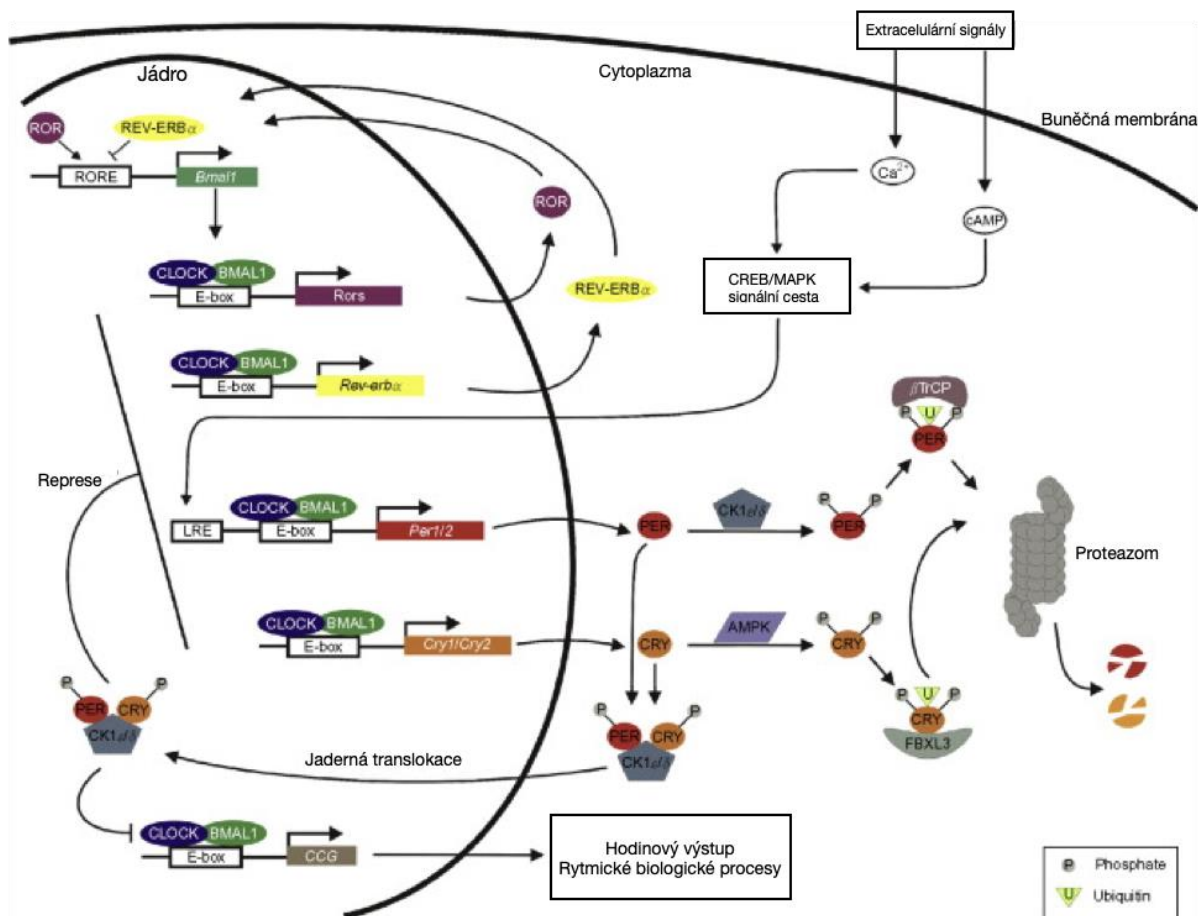
Gen *Clock* nevykazuje rytmické změny ve své expresi (Lee *et al.*, 2001), ale vykazuje rytmické změny ve své jaderné lokalizaci, která je závislá na proteinu BMAL1 (King *et al.*, 1997).

V promotoru genu *Bmal1* je sekvence, kterou rozeznávají proteiny ROR a REV-ERB. REV-ERB $\alpha$  funguje jako negativní regulátor transkripce *Bmal1*. Po jeho navázání na sekvenci RORE v promotoru *Bmal1* dochází k represi transkripce *Bmal1*. Exprese *Bmal1* je také pod cirkadiánní kontrolou, je to dáno tím, že exprese *Rev-erba* je řízena vazbou CLOCK:BMAL1 komplexu na E-box jeho promotoru (Preitner *et al.*, 2002). Prostřednictvím této regulační smyčky nepřímou cestou inhibuje svoji vlastní transkripci. Hladiny mRNA *Bmal1* dosahují v SCN maxima uprostřed subjektivní noci, tedy mezi CT15 – CT18 (S. M. Reppert and Weaver, 2001).

Hladiny mRNA genu *Nr1d1* (kódující jaderný receptor REV-ERB $\alpha$ ) dosahují maxima během subjektivního dne. *Rev-erba* kontroluje hladinu genu *Bmal1*, ale jeho prostřednictvím také dalších hodinových genů. Funguje především jako represor (Forman *et al.*, 1994).

Proteiny ROR mají funkci transkripčního aktivátoru genů *Bmal1* a *Rev-erba*. *Ror* geny jsou exprimovány v opačné fázi oproti genu *Rev-erba* a jejich mRNA je tak v maximu během noci (Preitner *et al.*, 2002).

Mezi hodinové geny se řadí i CKIε. Jedná se o serin/threoninovou protein kinázu, která obsahuje C-koncovou regulační doménu. Exprese této kinázy CKIε byla prokázána v SCN a i v periferních orgánech. Exprese této kinázy však nevykazuje však žádný cirkadiální rytmus (Lee *et al.*, 2001). Hlavní funkcí této kinázy je fosforylace hodinových proteinů, která vede k ubiquitinaci těchto proteinů a jejich degradaci v proteozomu. Touto regulací je omezena funkce členů negativní zpětnovazebné smyčky. Aktivita této kinázy je regulována inhibiční autofosforylací (Partch *et al.*, 2006).

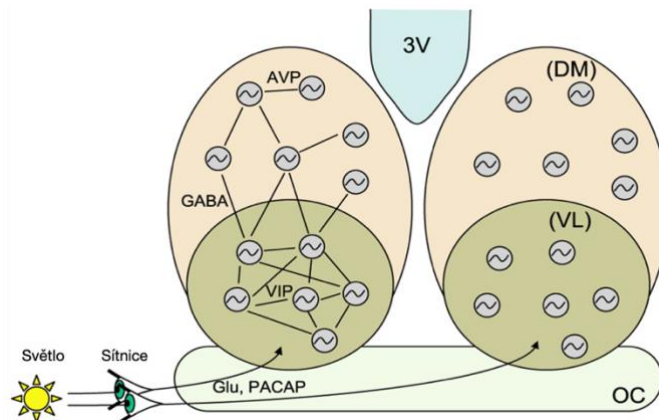


**Obrázek č. 1: Schéma molekulárních hodin u savců.** Genovou podstatu generování cirkadiálních oscilací tvoří pozitivní a negativní zpětnovazebné smyčky. Proteiny CLOCK a BMAL1 zastávají v primární smyčce funkci aktivátorů, proteiny PER a CRY zastávají v primární smyčce funkci represorů. V sekundární smyčce působí jako aktivátor transkripce genu *Bmal1* ROR  $\alpha/\beta/\chi$ . Proteiny REV-ERB  $\alpha, \beta$  zde naopak tlumí transkripci *Bmal1*. Proteiny PER a CRY jsou fosforylované CKI $\delta/\epsilon$  a degradované v proteozomu. Na obrázku je ukázána také vstupní cesta z extracelulárního prostoru, která vede ke změně dynamiky molekulárního mechanismu v důsledku působení synchronizátorů. Zvýšený tok vápníku v důsledku aktivace membránových receptorů vede k fosforylaci transkripčního faktoru CREB a indukci genů *Per* z promotorového místa CRE. PŘEVZATO z (Lowrey and Takahashi, 2011) a UPRAVENO.

### 2.1.2. Centrální cirkadiální hodiny

Uspořádání cirkadiálních hodin savců je hierarchické. Centrální cirkadiální hodiny generují rytmus a zároveň zajišťují synchronizaci s vnějším časem a také ovlivňují periferní hodiny umístěné v různých tkáních a buňkách. Hlavní cirkadiální hodiny se nacházejí v SCN v hypotalamu (Moore and Eichler, 1972; Zucker and Stephan, 1972). Jedná se o párové shluky

neuronů, které se nachází těsně nad překřížením optických nervů. U hlodavců je každé jádro tvořeno 8 000 – 10 000 neurony. Jádra se rozdělují na dvě části, které jsou definovány rozdílnou produkcí neuropeptidů a také odlišnou morfologií (Leak *et al.*, 1999). Tyto dvě části se nazývají jádro – oblast ventrolaterální (VL) a obal – oblast dorsomediální (DM). VL-SCN přijímá signály ze sítnice retinohypotalamickým (RHT) traktem, nepřímou cestou získává signály z intergenikulárního listku thalamu a serotogenní cestou z rapheálních jader mozkového kmene. DM-SCN pak přijímá signály z VL-SCN, z limbické oblasti a z hypotalamu. Tyto dvě části jsou mezi sebou propojeny velkým množstvím synapsí (Leak *et al.*, 1999). Neurony VL-SCN mezi sebou a s DM-SCN komunikují prostřednictvím vasoaktivního intestinálního peptidu (VIP) a gastrin-uvolňujícího peptidu, neurony dorsomediálního SCN zase prostřednictvím AVP. Většina neuronů SCN produkuje také kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) (Moore and Speh, 1993; obrázek č. 2).



**Obrázek č. 2: Strukturní zobrazení SCN.** SCN je vysoce propojená nervová tkáň, která leží po stranách třetí mozkové komory (3V). Je rozdělena do dvou identických částí, z nichž se každá skládá ze dvou skupin neuronů (jádro a obal, neboli VL-SCN a DM-SCN). Tyto dvě skupiny neuronů jsou rozlišené podle typu neurotransmiterů, které uvolňují. Ve VL-SCN převažuje exprese VIP. V DM-SCN převažuje exprese AVP a GABA. Pouze VL-SCN je citlivé na světlo, přijímá informace o světle z sítnice a tato informace se do SCN dostane odbočkou zrakové dráhy přes optické chiasma (OC). PŘEVZATO z (Hafner *et al.*, 2012) a UPRAVENO.

Jednotlivé neurony SCN generují cirkadiální rytmy s různě dlouhými periodami. Díky synaptické komunikaci jsou však vzájemně synchronizovány a výsledná perioda je integrací period jednotlivých neuronů (Van den Pol and Dudek, 1993).

Neurotransmitery GABA a VIP jsou zásadní pro vzájemnou synchronizaci SCN neuronů. GABA je nejzastoupenějším neurotransmiterem v celém SCN. Má excitační účinky v DM-SCN a inhibiční účinky v VL-SCN. Absence GABA neurotransmiteru znemožňuje synchronizaci VL- a DM-SCN. Právě excitační role GABAergního přenosu může hrát roli v komunikaci mezi VL- a DM-SCN (Albus *et al.*, 2005). Studie z roku 2014 totiž ukázala, že GABAergní excitační signalizace je častější v desynchronizovaných SCN než

v synchronizovaných SCN (Farajnia *et al.*, 2014), což naznačuje, že poměr excitační/inhibiční GABAergní signalizace hraje roli ve fázové synchronizaci jednotlivých SCN neuronů.

Primární neurotransmitter ve VL-SCN je VIP. Tento neurotransmitter depolarizuje neurony ve zbytku SCN a indukuje expresi *Per1* a *Per2* (Shinohara *et al.*, 2000). Hlavní úkol je tedy přenést informace o světle vedené ze sítnice mezi buňkami VL-SCN a tyto informace dále poslat do DM-SCN (Abrahamson and Moore, 2001). Neurotransmitter VIP je důležitý pro synchronizaci neuronů SCN, což je potvrzeno například tím, že eliminace VIP nebo eliminace VIP receptorů vede ke snížení amplitudy rytmu elektrické aktivity SCN, a následně ke snížení amplitud molekulárních a i behaviorálních rytmů (Brown *et al.*, 2006; Maywood *et al.*, 2006; Aton *et al.*, 2005).

Rovnováha mezi chemickou a elektrickou komunikací je důležitá pro modulaci synchronních SCN rytmů. Neuronální SCN síť je tvořena hodně mezibuněčnými spoji zvanými gap junction, což je typ spojení, které zprostředkovává elektrickou synchronizaci mezi SCN neurony (Colwell, 2000). Spojení zprostředkované tímto spojením zlepšuje konektivitu těchto neurálních sítí (Pfeuty *et al.*, 2003). Narušení buď jen elektrické, nebo jen chemické synchronizace vede k narušení cirkadiánní rytmicity nejen v SCN, ale i v periferních hodinách.

Svoji roli v synchronizaci oscilátorů v SCN má i humorální cesta. Humorální signály mohou SCN vnímat prostřednictvím receptorů, které se nacházejí na membráně neuronů. Nejdůležitější jsou receptory pro melatonin. Hormon melatonin se vytváří v epifyze a jeho tvorba je řízena z SCN. Hladina melatoninu je vysoká v noci a nízká přes den. Uvolněný melatonin poté zpětně působí na SCN a prostřednictvím melatoninových receptorů MT1 a MT2 moduluje fázi cirkadiánních oscilací (Vaněček *et al.*, 1987). Působení melatoninu na cirkadiánní pacemaker je stejné u denních i nočních živočichů (*více o melatoninu v kap. 2.2.2.*).

### 2.1.3. Synchronizační cesty ze sítnice k SCN

Hlavní dráha, která je nezbytná pro vedení informace o světle do SCN se nazývá RHT a je tvořena axony fotosenzitivních gangliových buněk (ipRGC, z anglického „*intrinsically photosensitiveretinal ganglion cells*“) s fotopigmentem melanopsinem (Berson *et al.*, 2002). Axony těchto buněk vedou světelnou informaci monosynaptickou glutamátergní drahou přímo do SCN.

Další vstupní dráha je polysynaptická a nazývá se genikulohypotalamická dráha. Jedná se o dráhu nepřímou, kde se informace vede z sítnice nejprve do intergenikulárního listku thalamu a až poté do VL-SCN. V této dráze se integrují světelné s nesvětelnými informacemi. Hlavním mediátorem této dráhy je neuropeptid Y (Moore and Card, 1994).

Třetí dráha je také nepřímá a je určena pro přenos nesvětelných informací. Dráha začíná v rapheálních jádrech ve středním mozku a vede do SCN. Tato dráha využívá jako mediátor serotonin (Sumova *et al.*, 1996).

#### 2.1.4. Sítnice a buňky ipRGC

Sítnice obsahuje tři typy fotoreceptorů: tyčinky, čípky a ipRGCs. ipRGC jsou gangliové buňky, které obsahují fotonopigment melanopsin a na rozdíl od tyčinek a čípků fungují pouze jako detektor intenzity difusního světla, nikoliv jako detektor kontrastu. Světlo vstupuje do oka, je zachycováno samotnými ipRGC a dále prochází vrstvami sítnice, až je detekováno vnějšími segmenty tyčinek a čípků. Ty pak přenáší informace mmj. také do ipRGCs, které depolarizují, a pošlou informace o světle do mozku do SCN, prostřednictvím svých axonů, které tvoří RHT (Berson *et al.*, 2002). ipRGC jsou tedy jednak fotoreceptory samy o sobě a za druhé přijímají informace i z tyčinek a čípků, což vede ke schopnosti organismů synchronizovat se k LD (Light/Dark světelné podmínky 12 hodin světlo, 12 hodin tma) cyklu, pokud jeden nebo dva z klasických fotoreceptorů chybí. Buňky ipRGC zaznamenávají celkovou dobu osvětlení (Provencio *et al.*, 2000). Melanopsin je v těchto buňkách skladován rovnoměrně ve většině částí gangliové buňky. Nedochozí k jeho koncentraci ve specializovaných strukturách. Necitlivější k modrému světlu je melanopsin, které je typické pro střední část dne. Odpovídá vlnové délce 480 nm (Berson *et al.*, 2002).

Buňky ipRGC jsou zodpovědné za tzv. neobrazové vidění. Přenášejí světelnou informaci z sítnice nejen do SCN, ale také projikují do center mozku regulujících náladu, spánek, bdění a kognitivní myšlení. Lze tedy říct, že světlo jak přímo (přes ipRGC), tak nepřímo (přes SCN) ovlivňuje funkce celé řady struktur mozku (Krout *et al.*, 2002).

## 2.2. Synchronizace cirkadiálního systému

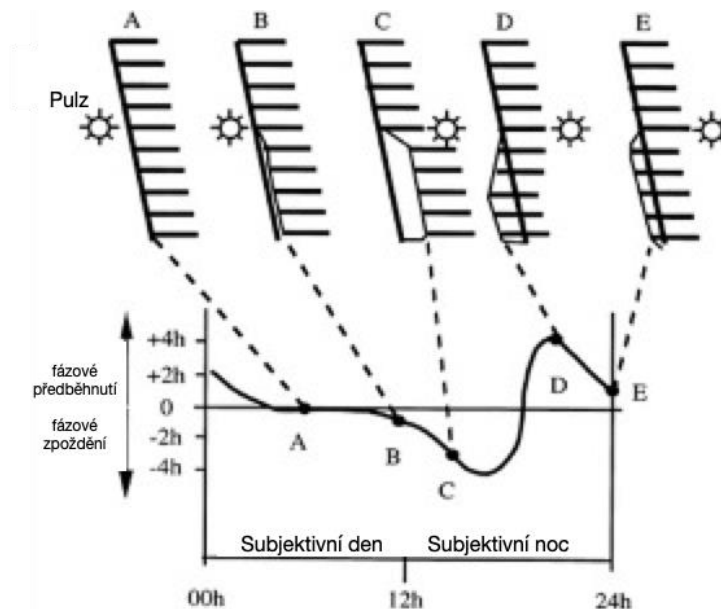
Síť tvořená hlavními a periferními hodinami udává čas synchronizovaný s vnějším solárním cyklem pro celý organismus. Každý oscilátor v této síti je schopný generovat cirkadiální periodu samostatně, ale už se nedokáže synchronizovat mezi sebou a také se solárním cyklem. K tomu slouží hlavní hodiny v SCN, které propojují celý časový systém a synchronizují jej s vnějšími podmínkami (Yamazaki *et al.*, 2000).

Mezi základní synchronizátory patří střídání světla a tmy. V závislosti na zeměpisné šířce, a v závislosti na ročním období se mění poměr mezi délkou dne a noci. Tato změna fotoperiody se promítá do délky subjektivního dne a subjektivní noci. Takto organismus zaznamenává



jednak délku fotoperiody a také to, jestli se prodlužuje nebo zkracuje, a časuje tak kritická období života do optimálních vnějších podmínek.

Pro synchronizaci cirkadiálního systému světlem existují dvě teorie. Teorie neparаметrická, která říká, že synchronizace je dosaženo denními fázovými posuny takového rozsahu, aby vyrovnaly rozdíl mezi periodou vnějšího rytmu a periodou endogenního rytmu. Tato teorie byla navržena v roce 1981 profesorem Pittendrighem. Teorie dále říká, že velikost a směr fázového posunu jsou závislé na době aplikace světelného pulzu. Světelný pulz vyvolává fázové zpoždění, když je aplikován na začátku noci či subjektivní noci, a naopak vyvolává fázové předběhnutí, když je aplikován na konci noci či subjektivní noci. Velikost a směr fázového posunu vyjadřuje fázově responzní křivka (PRC, z anglického „*phase response curve*“; obr. č. 3).



**Obrázek č. 3:** Fázově responzní křivka rytmu motorické aktivity nočního hlodavce. Světelný pulz v různých časových bodech (A, B, C, D, E) má za následek různé odpovědi podle toho, kdy byla načasovaná expozice světlu. V bodě A nemá žádný účinek, v bodě B a C má za následek fázové zpoždění a v bodě D a E fázové předběhnutí. PŘEVZATO z (Touitou et al., 2017) a UPRAVENO.

Organizmy, které mají vnitřní periodu kratší než 24 hodin, potřebují světelný pulz zvečera, naopak organizmy, které mají vnitřní periodu delší než 24 hodin, potřebují světelný pulz zrána k tomu, aby se vyrovnala jejich perioda s přesnou 24h periodou vnějšího cyklu. Je potřeba zmínit, že uprostřed noci se nachází bod, který nezpůsobuje ani zpoždění, ani předběhnutí – tedy žádný posun. Tato křivka slouží jako užitečný nástroj odhadu velikosti předpokládaného posunu, pokud víme, kdy bude světlo působit.

Druhá teorie, která se nazývá jako parametrická, byla navržena v roce v sedmdesátých letech profesorem Aschoffem. Tato teorie je založena na předpokladu, že perioda vnitřního

cyklu je nastavená shodně s externím cyklem a také, že změny v periodě se dějí okamžitě v důsledku změn světelných podmínek.

V přirozených podmínkách probíhá obvykle synchronizace volného běhu celou fotoperiodou, tedy parametricky. Oscilátor ale reaguje neparаметricky jen na začátek a na konec světelné fotoperiody, které dopadají do aktivních fází PRC. Bylo ale dokázáno, že pouze jeden světelný pulz denně, který je aplikován v období citlivosti hodin na světlo, stačí ke kompletní synchronizaci vnitřních hodin (Pittendrigh and Daan, 1976).

### 2.2.1. Synchronizace světlem – molekulární podstata

Akční potenciál generovaný buňkami ipRGC přenáší RHT na synapsi neuronů VL-SCN, kde dojde k vylití mediátoru glutamátu a hypofyzárního adenylát cyklázu aktivujícího proteinu (PACAP). Glutamát se naváže na N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory, které se nacházejí na postsynaptické membráně neuronů VL-SCN a dojde ke vstupu  $Ca^{2+}$  do buňky. Vstup vápníku do buňky vede kaskádou intracelulárních procesů k fosforylaci transkripčního faktoru CREB (z anglického „*cAMP response element-binding protein*“). Tento faktor se váže na CRE vazebný element (z anglického „*cAMP response element*„) v oblasti promotoru genů *Per1* a *Per2* a tím spouští expresi těchto genů. Tato akce vede k fázovému posunu a k seřízení molekulárních mechanismů cirkadiálních hodin (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002). Neuropeptid PACAP má v této kaskádě modulační funkci, dokáže zvýšit efekt glutamátu (Michel *et al.*, 2006). Tato intracelulární kaskáda se liší podle toho, jestli světlo vyvolává fázové předběhnutí nebo zpoždění. Pokud světlo působí v první polovině noci, tak dojde k vylití glutamát, který aktivuje MAP kinázovou dráhu. CREB je fosforylován kinázou ERK1/2 a to vede k tomu, že se CREB pomocí CRE elementů naváže do promotoru hodinových genů a aktivuje tak jejich expresi. Pokud však světlo působí v druhé polovině subjektivní noci, tak  $Ca^{2+}$  indukuje  $Ca^{2+}$  dependentní kalmodulin protein kinázu, což je kináza aktivující NO syntázu. Poté dochází k aktivaci guanylát cyklázy, ta přemění necyklický guanylát monofosfát (GMP) na cyklický cGMP. Tato cyklická forma aktivuje cGMP dependentní protein kinázu a tato fosforyluje CREB (Ding *et al.*, 1997). Genovou expresi hodinového genu *Per* tedy spustí vazba na CRE, což způsobí fázový posun a seřízení hodin.

### 2.2.2. Synchronizace periferních hodin světlem

Světlem synchronizovaná perioda a fáze cirkadiálních oscilací v SCN je sdílena s periferními hodinami. Periferní hodiny dokáží běžet samostatně, ale právě vzájemná synchronizace je závislá na signálech z SCN. Jsou však výjimky a to jsou metabolicky aktivní

orgány (játra, slezina, střeva), kde je možné odpojení od SCN. V tomto případě je možná synchronizace časovaným příjmem potravy (Damiola *et al.*, 2000).

Zprostředkování světelné informace periferním orgánům se děje pomocí časovaného výlevu neurohormonu melatoninu, kortizolu, regulací tělesné teploty i potravního chování. Jak bylo řečeno výše, melatonin je hormon tvořící se v epifyze. SCN je sympaticky propojeno s epifyzou dráhou vedoucí přes paraventriculární jádro hypotalamu (PVN), dále dráha pokračuje do intermediálního sloupce míchy (IML) a odsud do cervikálního ganglia sympatiku (SCG). Postgangliové neurony SCG vedou k epifyze, kde dochází k během noci k výlevu noradrenalinu ze synaptického zakončení. Během dne je zvýšená GABAergní inhibice do PVN. Ustává aktivace IML a dochází k potlačení uvolňování noradrenalinu. V noci se noradrenalin naváže na  $\beta$ -adrenergní receptory, tím se zvýší hladina cAMP (cyklický adenosit 3', 5'-monofosfát), což vede ke stimulaci proteinkinázy A. Tato kináza následně aktivuje transkripci genu pro enzym arylalkylamin N-acetyltransferázu (*Aanat*) (Klein and Weller, 1970). Hladina i aktivita tohoto enzymu je tedy pod přímou kontrolou SCN. Hladina melatoninu vykazuje cirkadiální rytmus v závislosti na regulaci enzymu AANAT. V noci je hladina tohoto enzymu vysoká, stoupá tak i hladina melatoninu. Melatonin je dále sekretován do krve a také do mozkomíšního moku. Sekrece melatoninu je časována na dobu noci či subjektivní noci, avšak pro její správný průběh je nutné splnit ještě jednu podmínku, a tou je tma. Když dojde k vystavení se světlu v noci, tak se zvýší elektrická aktivita SCN, což vede ke zvýšení inhibiční neurotransmise do PVN. To má za následek zastavení syntézy melatoninu (Kalsbeek *et al.*, 2000). Délka produkce melatoninu také kopíruje délku noci. To vede k tomu, že délka signálu melatoninu dokáže organizmům dát informace o denní a roční době a je tedy hlavní spouštěč fotoperiodických změn, jako je například hibernace nebo sezónní rozmnožování.

### 2.2.3. Cirkadiální systém ve strukturách mozku

Periferní cirkadiální hodiny nejsou pouze v orgánových soustavách a tkáních, existují také ve všech částech mozku, a mluvíme o nich jako o periferních ve vztahu k SCN. Nejlépe popsán jsou cirkadiální rytmy generované v hipokampu, kortexu a sítnici oka.

Hipokampus je zásadní pro uchování dlouhodobé paměti a učení. Svoji roli hraje i ve formování emocí. Hipokampus je struktura, která exprimuje všechny hodinové geny, které jsou potřebné pro autonomní generování cirkadiálního rytmu (Jilg *et al.*, 2010). Hipokampus je neurálně propojen s SCN multisynapticky (Krout *et al.*, 2002). Synchronizace struktur hipokampu z SCN však probíhá zejména přes rytmickou produkci kortikosteroidů, která je závislá na signálech z SCN. Význam cirkadiálních hodin v SCN pro funkci hipokampu bývá

testován v testu „*long-term object recognition*“ (Ruby *et al.*, 2013). Poškození hlavních cirkadiálních hodin v SCN způsobuje deficit této paměti (Wardlaw *et al.*, 2014). Vliv na funkci hipokampu má i melatonin, který zvyšuje expresi genů *Per* a *Bmal1* v této části mozku. Ve studii (Ikeno and Nelson, 2015) bylo dále ukázáno, že melatonin může vést k remodelaci neuronů v hipokampu a tím způsobit změny v cirkadiálním a fotoperiodickém systému. Hipokampus je také citlivý na změnu fotoperiody. Remodelace neuronů se mění s cirkadiální periodou v závislosti na fotoperiodě (Ikeno *et al.*, 2013). Správný rytmus SCN se zdá být nezbytný pro správnou funkci hipokampu. Proto se dá předpokládat, že narušení funkce SCN stálým světlem během raného postnatálního vývoje bude negativně ovlivňovat behaviorální procesy závislé na hipokampu.

Všechny hodinové geny potřebné pro generování cirkadiálního rytmu generuje také neokortex (Rath *et al.*, 2013). Tato struktura je ale závislá na SCN, protože kompletní léze SCN vede k potlačení amplitudy rytmu hodinových genů v neokortexu (Rath *et al.*, 2013). Například pro schizofrenii je typické potlačení či posunutí fáze rytmické exprese v prefrontálním kortexu (Seney *et al.*, 2019).

Sítnice je považována za semiautonomní oscilátor (Remé *et al.*, 1991). V případě léze SCN si sítnice zachovává původní periodu i fázi cirkadiálních rytmů. Tato fáze je synchronizovatelná světlem nezávisle na SCN (Tosini and Menaker, 1996). Cirkadiální oscilátory byly v sítnici objeveny jak ve fotoreceptivních buňkách (M. J. Bailey *et al.*, 2002), tak v buňkách gangliových (Garbarino-Pico *et al.*, 2004). Sítnice produkuje melatonin a to dokonce v podmínkách *in vitro*, a v podmínkách stálé tmy zachovává rytmickou produkci melatoninu minimálně pět dní (Tosini and Menaker, 1996).

### 2.3. NMDA a jeho podjednotky

NMDA receptor patří do třídy glutamátových ionotropních receptorů. Jsou to iontové kanály, které jsou aktivovány excitační aminokyselinou L-glutamátem (Hayashi, 1954). Od ostatních receptorů této třídy se liší svoji citlivostí k agonistovi NMDA, který byl syntetizován v roce 1963 (Curtis and Watkins, 1963). Hlavním excitačním neuropřenašečem v CNS je právě L-glutamát. Tyto receptory jsou stěžejní při excitačním synaptickém přenosu v centrální nervové soustavě – spouštějí dlouhodobé změny v synaptickém přenosu – potenciaci či depresi. A právě dlouhodobá potenciace či deprese v hipokampu hrají nezastupitelnou roli v mechanismech paměti a učení (Kessels and Malinow, 2009).

NMDA receptory se skládají ze 4 podjednotek. Tyto podjednotky tvoří centrální iontový kanál. NMDA receptory tak tvoří funkční heterotetramery. Skládá se ze dvou podjednotek

GluN1. Tyto podjednotky vážou koaktivátoru receptoru glycin (Kuryatov *et al.*, 1994). Dále se receptory skládají ještě ze dvou podjednotek GluN2 vázající glutamát (Anson *et al.*, 1998). Ve strukturách koncového mozku jsou z GluN2 nejvíce zastoupeny podjednotky A a B (Chazot and Stephenson, 1997). Rozdíl mezi jednotlivými podjednotkami GluN2 je v afinitě k ligandu.

V prvních třech týdnech postnatálního vývoje se mění zastoupení jednotlivých podjednotek NMDA receptoru v mozku, včetně SCN (Z. Bendová *et al.*, 2009). Ode dne narození až do druhého/třetího týdne života se rapidně navyšuje exprese GluN1 a GluN2a podjednotek v nervových buňkách. Toto navýšení bylo zaznamenáno i v kortexu, hipokampu, talamu a mozečku. Odlišná situace je ale u GluN2b podjednotky. Exprese této podjednotky dosahuje maxima už na konci prvního postnatálního týdne. Už od prvního dne narození je exprese GluN2b vyšší než pro jednotku GluN2a a do konce prvního týdne vývoje toto převýšení trvá. Na konci prvního týdne pak exprese i zastoupení GluN2a na synapsi převyšují a tak to už zůstane (Riva *et al.*, 1994)

NMDA receptory a zejména podjednotka GluN2b jsou stěžejní pro světelnou synchronizaci cirkadiálních rytmů v SCN (Zdeňka Bendová *et al.*, 2012). Změna podjednotkového složení receptorů NMDA a může být také příčinou rozvoje řady neurodegenerativních či neurovývojových onemocnění (Paoletti *et al.*, 2013).

## 2.4. Stálé světlo

Pro správné fungování cirkadiálního systému je velmi důležitá světelná synchronizace a především pak vysoký kontrast mezi dnem a nocí.

V dnešní době však velmi často dochází ke snižování výše zmíněného kontrastu mezi dnem a nocí, což je dáno pouličním osvětlením, osvětlením v domácnostech a i faktem, že se člověk přes den vyskytuje především ve vnitřních prostorech. Tyto faktory vedou k tomu, že na člověka přes den působí méně světla. Naopak k večeru je člověk často vystavován nepřiměřeně silnému umělému světlu. Organismy ve volné přírodě jsou zase vystavovány pouličnímu osvětlení a to vede k tomu, že jsou ohroženy trvale se zvětšujícím světelným znečištěním. To dohromady vede k tomu, že rozdíl mezi dnem a nocí není tak velký, jak by měl ke správnému fungování cirkadiálních hodin být. Dochází k narušení adaptace ke změnám fotoperiody, která je důležitá například pro sezónní rozmnožování.

### 2.4.1. Úroveň světelného znečištění

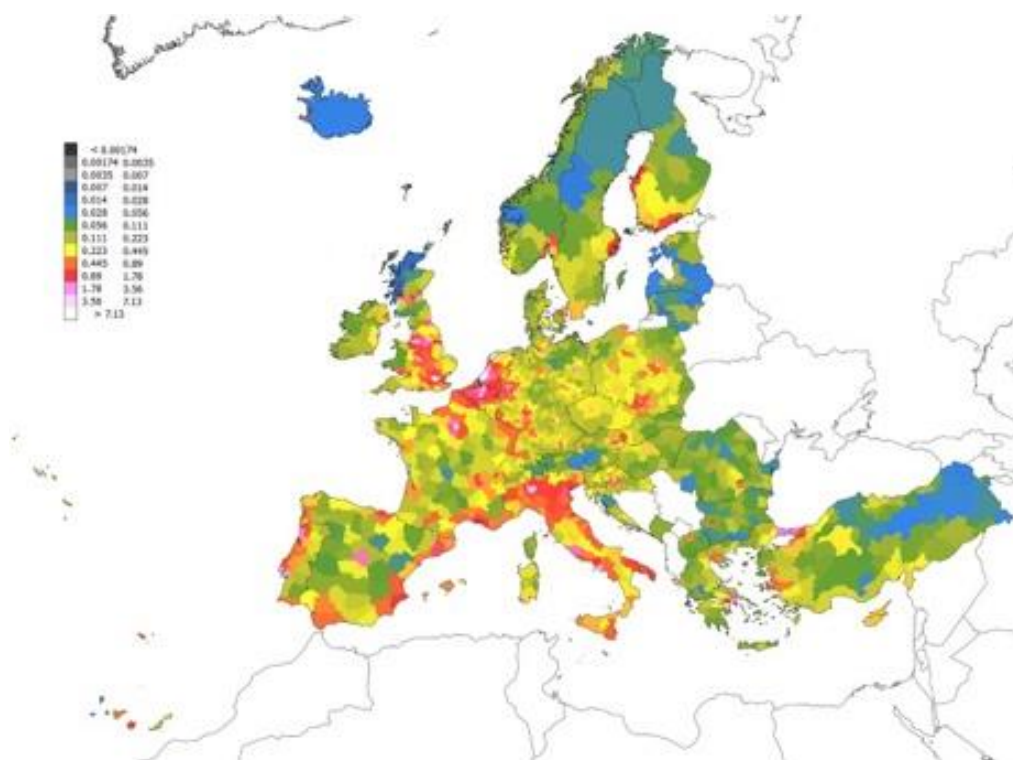
Světelné znečištění je změna úrovně přirozeného nočního osvětlení způsobená antropogenními zdroji světla (Cinzano *et al.*, 2000). Během 20. století vedl jednak vynález

elektriny a žárovky, tak i rychlý nárůst lidského osídlení, dopravní infrastruktury atd. k tomu, že se zvětšují plochy osvětlované v noci umělým světlem. To vede k tzv. světelnému znečištění, způsobenému jak přímým působením světelného zdroje, tak rozptylem světla v atmosféře. Již v roce 2001 se odhadovalo, že 19 % celkového povrchu země je nad prahovou hodnotou světla stanovenou pro znečištěný stav (Cinzano *et al.*, 2001). Dle údajů z roku 2016 žije 83 % světové populace pod světlem znečištěnou oblohou (to je místo, kde je umělé světlo za zenitu větší než  $14 \mu\text{cd}/\text{m}^2$ ). Více než třetina lidstva nevidí Mléčnou dráhu kvůli světelnému znečištění. Země s nejméně světlem znečištěnou oblohou jsou Čad, Středoafriická republika a Madagaskar. Nejvíce znečištěnou zemí je Singapur, dále Kuvajt a Katar (Fabio Falchi *et al.*, 2016).

Světelné znečištění je velký problém v oblasti životního prostředí a stejně tak je to problém, který je spojený se zdravím jedince. Přespříliš světla v noci je spojováno s depresí, nespavostí a dalšími poruchami zdraví u lidí. U živočichů je tento problém spojován se změnami ve vyhledávání potravy, v navigaci nebo také se změnou reprodukčního chování (Longcore and Rich, 2004; Navara and Nelson, 2007; Gaston *et al.*, 2013).

V současnosti je tento problém umocněn plošným využíváním světelných zdrojů LED, které vyzařují intenzivní bílé světlo s velkým množstvím modré složky, na místo dříve spíše používaných žárovek a nízkotlakého sodíkového světla, které vyzařovaly spíše světlo žluté.

Na obrázku č. 4 je znázorněn průměrný umělý jas noční oblohy nad Evropou. Jednotky jsou  $\text{mcd}/\text{m}^2$ . V Evropě má nejvyšší světelné znečištění noční oblohy Delft v Nizozemsku. Noční obloha je zde téměř 7000krát světlejší než nejtemnější region Eilean Siar ve Velké Británii. Je třeba brát v potaz, že data jsou zprůměrovaná na provincie, proto například Madrid vykazuje menší světelné znečištění, ale to je dáno především tím, že se nachází ve velké provincii (F. Falchi *et al.*, 2019).



**Obrázek č. 4:** Mapa - New World Atlas of Artifical Night Sky Brightness, Suomi NPP satelit. PŘEVZATO z (F. Falchi *et al.*, 2019).

#### 2.4.2. Vliv stálého světla na organizmus

Cirkadiánní systém ovlivňuje fyziologické děje a narušení tohoto systému stálým světlem logicky vyústí k mnoha patologickým. Stálé světlo vede k desynchronizaci jednotlivých periferních oscilátorů jak od SCN, tak od sebe navzájem. Stálé světlo však nenaruší generování cirkadiánních rytů. Narušení synchronizace cirkadiánního systému stálým světlem je spojováno například se zvýšeným rizikem výskytu rakoviny (Guerrero-Vargas *et al.*, 2017; Agbaria *et al.*, 2019), s poruchami energetického metabolismu (Coomans *et al.*, 2013; Báez-Ruiz *et al.*, 2017), či se zvýšenou anxiétou (Roman and Karlsson, 2013).

K akutnímu narušení vývoje cirkadiánních hodin, ale i k dlouhodobému efektu dochází, pokud jsou mláďata po narození chována na stálém světle. Zvířata chovaná v mládí na stálém světle jsou náchylnější ke ztrátě rytmicity, pokud jsou opakovaně vystavována stálému světle, v porovnání se zvířaty, která byla od narození chována na klasickém světelném režimu (Ohta *et al.*, 2006).

#### 2.4.3. Vliv sníženého světelného kontrastu mezi dnem a nocí na organizmus

Je třeba zmínit, že intenzita nočního světla potřebná pro vyvolání signifikantních rozdílů ve fyziologických a behaviorálních procesech se druhově liší. Studie z roku 2016 ukázala na vzorku dvaceti dobrovolníků, že intenzita světla 10 luxů během spánku zhoršuje výsledky

v testech pracovní paměti a dále také snižuje aktivitu ve vybraných částech mozku, které byly měřeny pomocí metody fMRI. Intenzita 5 luxů v této studii nevyvolala žádné signifikantní zhoršení (Kang *et al.*, 2016). U potkanů bylo dokázáno, že už intenzita světla 5 luxů během spánku má vliv na kvalitu spánku (Stenvers *et al.*, 2016). Expozice 5 luxům vedla u myši k narušení kognitivního a i sociálního chování, k downregulaci *Bdnf* (z anglického „*brain-derived neurotrophic factor*“), CREB a sirtuinu 1 jak na úrovni proteinů, tak na úrovni mRNA (Namgyal *et al.*, 2020). Studie z roku 2020 zjistila, že tlumené světlo v noci (5 luxů) indukuje chladovou hyperalgií a mechanickou alodýnií to pravděpodobně prostřednictvím zvýšení neuro zánětu a dysregulace opioidního systému u myši (Bumgarner *et al.*, 2020). Dále bylo dokázáno, že expozice tlumenému světlu (5 luxů) v noci během raného života zvyšuje úzkostné a strachové chování. Tato studie dále zjistila změnu exprese hodinových genů v hypotalamu, což dohromady se změnou chování poukazuje na to, že vliv tlumeného světla během noci bude hrát význam ve vývoji cirkadiálního rytmu (Cissé *et al.*, 2016).

#### 2.4.4. Lidé a elektronická zařízení

Používání elektronických zařízení ke komunikaci, k práci, ale i k zábavě se v posledních letech výrazně zvýšilo. S tím však vzniká problém používání těchto elektronických zařízení zvečera. Bylo dokázáno, že používání elektronických čteček, mobilních telefonů či tabletů ve večerních hodinách po dobu delší než dvě hodiny vede k signifikantnímu potlačení produkce melatoninu (Wood *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2015). Používání těchto zařízení před spaním vede k prodloužené době usínání, snižuje množství a zpožďuje načasování REM spánku a snižuje bdělost další ráno (Chang *et al.*, 2015). Je to dáno tím, že světlo je nejúčinnějším signálem, který ovlivňuje cirkadiální hodiny. Používání elektronických zařízení zvečera a vystavování se modrému světlu prodlužuje cirkadiální periodu a dává tělu signál, že je ještě den. Na světle také nedojde tak k produkci melatoninu a následný spánek není kvalitní. Dlouhodobé problémy se spánkem pak mohou vést k významnému snížení kvality života a mohou být příčinou vzniku závažných onemocnění (Guerrero-Vargas *et al.*, 2017; Cos *et al.*, 2006; Roman and Karlsson, 2013).

Hladinu melatoninu se u člověka začne zvyšovat večer mezi devátou a jedenáctou hodinou. Maxima dosahuje mezi dvanáctou a čtvrtou hodinou ranní. K poklesu na denní hodnotu pak dochází mezi sedmou a devátou hodinou ranní (Lynch *et al.*, 1975). V současnosti je za nejúčinnější spektrum, které způsobuje potlačení melatoninu, považován rozsah vlnových délek 450 – 480 nm, což odpovídá modrému světlu (Gooley *et al.*, 2010). A právě modré světlo produkují ve vysoké míře LED diody, které jsou používány v televizích, monitorech, chytrých



telefonech a tabletech. Ve večerních hodinách bychom se tedy měli vyhnout vystavování se modrému světlu. Pokud to je z nějakého důvodu nemožné, je vhodné si na chytrých zařízeních nastavit noční režim, který omezí produkci modrého světla. Případně lze použít i speciální brýle, které dokážou odfiltrovat modrou složku světla.

## 2.5. Vývoj cirkadiánního systému

Cirkadiánní hodin v SCN se vyvíjí během prenatalního a časně postnatalního období. Už delší dobu je známo, že mateřský cirkadiánní systém není nezbytný pro morfologický vývoj cirkadiánního systému mláďat. Tento fakt byl dokázán ve studii z roku 1988, kde bylo ukázáno, že se samicím bez SCN narodila mláďata s plně funkčním cirkadiánním systémem (Davis and Gorski, 1988). Cirkadiánní rytmy mláďat takových samic však nejsou mezi sebou synchronizované do stejné fáze (Reppert and Schwartz, 1986). Mezi dny E13,5 – E17 prenatalního vývoje dochází k tvorbě většiny nervových buněk SCN. V tomto období je již také možné měřit expresi hodinových genů v ještě nedokončených orgánech na periferiích. Tato exprese je však zatím arytmiická (Landgraf *et al.*, 2015). Shluky periventrikulárních buněk v SCN jsou tvořeny v E17. V E18 je neurogeneze již dokončena. Z důvodu nedostatečného počtu synapsí ale zatím není funkční mezibuněčné propojení. Mezi P4 a P10 dochází u potkana k rozvoji synaptogeneze (Moore and Bernstein, 1989).

V P10 je plně dotvořen retinohypotalamický trakt, což je trakt přenášející informace o světle. Převážně až po narození se objevuje detekovatelná rytmická exprese hodinových genů v SCN a vyvíjí se až do P10. Cirkadiánní oscilace jsou přizpůsobené rozdílné délce dne také už v P10 (Bendová *et al.*, 2004). Den po otevření očí mladého potkana, tedy v P15, je citlivost a odpověď SCN a sítnice na přítomnost světla již plnohodnotná (Llamosas *et al.*, 2000). K dokončení maturace SCN u potkana dochází během 3. týdne postnatalního vývoje.

### 2.5.1. Význam SCN matky pro vývoj cirkadiánního systému mláďat

Přítomnost SCN matky je nutná pro synchronizaci rytmu metabolické aktivity SCN fetu (Reppert and Schwartz, 1986). Fáze objevující se rytmické exprese hodinových genů ve fetálních SCN je stejná jako fáze SCN matky (Kováčiková *et al.*, 2006), což znamená, že fáze je nastavena již prenatalně fází maternálních SCN. Také se zjistilo, že fetální SCN jsou, na rozdíl od SCN matek a dospělých savců, citlivá na synchronizaci potravou. Toto prokázal experiment z roku 1989, ve kterém byla periodicky podávána potrava březím samicím potkana bez SCN, a fáze podávání potravy se odrazila ve fázích cirkadiánních oscilací v SCN mláďat (Weaver and Reppert, 1989). SCN matky má tedy pouze synchronizační vliv na vyvíjející se

cirkadiánní systém jejich mláďat. Mateřské signály synchronizují SCN i během postnatálního života, důležité to je hlavně během prvních dnů po porodu. Důležitý je věk P6, kdy se hlavním synchronizátorem stává světlo (Ohta *et al.*, 2002). Odstranění mateřského SCN však nezabrání vývoji hodinového mechanismu v postnatálním období (Reppert and Schwartz, 1986).

Mechanismy, pomocí kterých matka nastavuje fázi cirkadiánních hodin mláďat, nejsou plně známé. Je pravděpodobné, že se jedná o komplex rytmických signálů, které mohou SCN plodu synchronizovat. Do tohoto komplexu mohou patřit rytmy behaviorální, hormonální nebo třeba metabolické.

### 2.5.2. Vývoj sítnice oka

Vývoj fotoreceptorů v sítnici probíhá různě rychle. U myši se tyčinky vyvíjí v E12, ale fotopigment tyčinek – rhodopsin – je exprimován až v P5. Obdobná situace je u čípků, kde čípky jsou diferencované v E10, ale fotopigment čípků – coneopsin – se exprimuje až v P7. Vnější segment fotoreceptoru, který detekuje světlo, se vyvíjí mezi P4-P20. Od P10 je vyvinuto dostatečně elementů k tomu, aby tyčinky a čípky začaly být fotosenzitivní. Plná fotosenzitivita ale nastává až v P20 (Fei, 2003). Oko se otvírá mezi P13 a P15.

ipRGCs se vyvíjí obdobně, ale poněkud rychleji. ipRGCs se diferencují v E10 a exprese melanopsinu začíná již v E10,5. Každopádně konektivita mezi sítnicí a SCN přes RHT dosáhne plné funkčnosti až od P15 (Brooks and Canal, 2013). Ale přesto bylo ve studii z roku 2010 ukázáno, že mláďata potkanů vnímají světlo hned po narození i přes zavřená víčka. Studie totiž ukázala fotoindukci okamžitého raného genu *c-fos* ve vrstvě gangliových buněk již v P1. Až do P5 byly buňky lokalizovány v dorzální části sítnice, po celém obvodu sítnice byly buňky distribuovány v P10 (Matějů *et al.*, 2010).

### 2.5.3. Stálé světlo během kritické fotoperiody

Kritické období citlivosti na světlo bylo stanoveno na interval mezi P10 a P20. Studie ukázala, že vystavení stálému světlu mezi těmito dny má za následek snížení světlem indukovaného fázového posunu exprese hodinových genů v dospělosti (Canal-Corretger *et al.*, 2001). Stejná studie také ukázala, že vývoj cirkadiánního rytmu dospělého potkana pod stálým světlem závisí na počtu dnů ve stálém světle během laktace.

Studie z roku 2009 ukazuje, že zvířata, která v mládí vyrůstají na stálém světle, mají v dospělosti snížené hladiny VIP a AVP v SCN, což jsou neuropeptidy podílející se na synchronizaci SCN. Rozdíly v expresi AVP byly nalezeny i v paraventrikulárním a supraoptickém jádru, což jsou oblasti mozku, které dostávají informace z SCN. Tyto výsledky

naznačují, že expozice stálému světlu v postnatálním období může ovlivnit funkci SCN a tedy i výstup z SCN (Smith and Canal, 2009). Jiná studie z roku 2018, která zkoumala důsledky narušení cirkadiálního systému stálým světlem během laktace, potvrdila tyto nálezy. V této studii také došlo ke ztrátě rytmicity a ke snížení hladiny VIP a AVP v SCN. Mláďata byla po laktaci vystavena standardním LD podmínkám, k obnově rytmicity však nedošlo, stejně jako hladiny VIP a AVP zůstaly sníženy (Palma-Gómez *et al.*, 2018).

Zvířata vystavená stálému světlu v mládí měla zvýšenou amplitudu exprese *Per2* v SCN. Lze tedy říct, že stres stálého světla během časného vývoje vede k adaptačnímu přizpůsobení a kvůli vyšší amplitudě *Per2* exprese posiluje synchronizaci mezi buňkami SCN (Brooks *et al.*, 2014).

Expozice stálému světlu v juvenilním věku také vede ke strukturálním změnám astrocytů v SCN (Canal *et al.*, 2009). Astrocyty mají funkci v regulaci cirkadiálního chování a je pravděpodobné, že se podílí i na přenosu světelné informace v SCN (Lavialle *et al.*, 2001).

## 2.6. Účinek světla na vývoj rytmu lokomoční aktivity

Rytmus lokomoční aktivity je postnatální jev. Ve většině případů je u zvířat nejdříve ultradiální rytmus, který se časem mění na cirkadiální. To je vidět například na vývoji rytmu tělesné teploty (Kittrell and Satinoff, 1986) nebo na vývoji cirkadiální exprese serotoninu (Asano, 1971). Po narození nejsou oscilátory synchronizovány, což má za důsledek právě výskyt ultradiálních rytmů. Během vývoje se oscilátory synchronizují, což má za následek vývoj cirkadiálního rytmu

V roce 1991 byla provedena studie, kde byl studován účinek světla na vývoj rytmu lokomoční aktivity potkana. Bylo ukázáno, že světlo má inhibiční účinek na vnitřní synchronizaci mezi oscilátory, které řídí rytmus lokomoční aktivity potkana, což vede ke zpoždění vývoje tohoto rytmu (Cambras and Díez-Noguera, 1990).

Dále bylo dokázáno, že u potkanů chovaných pod stálým světlem je zachován robustnější cirkadiální rytmus lokomoční aktivity, pokud se do stálého světla dostanu opakovaně v dospělosti. Tito potkani také vykazovali větší fázové posuny po aplikaci světelného pulzu v DD (dark/dark světelné podmínky – 24 hodin tma) oproti potkanům chovaných v podmínkách stálé tmy. Zdá se tedy, že když stálé světlo působí během vývoje, tak může vyvolat změny v organizaci cirkadiálního systému a tyto změny mohou být dlouhodobé (Cambras *et al.*, 1998). A tyto změny v organizaci cirkadiálního systému pak mohou ovlivnit odezvu dospělého jedince na světlo (Canal-Corretger *et al.*, 2000). To potvrzuje i studie z roku 1977, kde studovali lokomoční aktivitu potkanů, kteří byli po skončení laktace umístěni do LL podmínek. Potkani

chování během laktace na LL vykazovali rytmus lokomoční aktivity i po ukončení laktace. Zatímco potkani, kteří byli chováni během laktace na DD a po ukončení laktace byli umístěni do LL rytmus lokomoční aktivity nevykazovali (Cambras *et al.*, 1997).

Je uváděno, že mezi laboratorními zvířaty je potkan nejcitlivější na škodlivé účinky světla (Noell and Albrecht, 1971). To je také důvod, proč byl můj experiment prováděn na černoookých potkanech kmene Long-Evans, na místo klasičtějších potkanů kmene Wistar. Potkani kmene Wistar jsou albíni a mohlo by u nich dojít k poškození sítnice vlivem stálého světla a výsledky by nemusely být relevantní. Pigmentovaní potkani jsou obecně v pokusech se světlem lepším modelem.

### 3. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký má vliv vystavení stálému světlu o intenzitě 16 luxů během časně postnatálního vývoje potkana na vývoj cirkadiálního systému ve strukturách mozku. Dále bylo cílem zjistit, jaký vliv má expozice stálému světlu na lokomoční aktivitu potkana.

Mladí potkani byli chováni na stálém světle v postnatálním období P0 - P20. Byly zkoumány změny v genové expresi hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Nr1d1*, dále *Aanat*, *Stat3*, *Bdnf*, *Grin1*, *Grin2a* a *Grin2b*, navíc ještě tkáňově specifické geny *Opn4*, *Opn5*, *Opn1* a *Rho*. Změny v genové expresi výše zmíněných genů byly zkoumány v SCN, v hipokampu, ve frontálním kortexu a v sítnici. Změny byly určeny pomocí metody kvantitativní real-time polymerázové řetězové reakce (RT-q PCR).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Chemikálie

#### Barvení řezů:

100%, 95%, 90%, 75% a 70% ethanol

1% cresyl violet acetát

#### Izolace RNA

Direct-zol<sup>TM</sup> RNA Miniprep Kit (Zymo Research)

RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen)

#### Reversní transkripce:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific)

Enhanced Avian Reverse Transcriptase eAMV RT (Sigma-Aldrich)

#### Preamplifikace:

TaqMan PreAmp MasterMix (Thermo Fischer Scientific)

#### Kvantitativní RT-PCR:

5xHOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne)

Fluorescenčně značené próby TaqMan (tabulka č. 1)

### 4.2. Laboratorní zvířata

K experimentu jsme použili samce a samice potkanů kmene Long-Evans (Charles River Laboratories International). Zvířata byla chována v akreditovaných chovných nádobách se standartní podestýlkou a s přístupem k potravě a vodě *ad libitum*. Teplota v chovné místnosti byla udržována na pokojové teplotě  $23 \pm 2$  °C. Byl použit lineární zdroj bílého LED světla (CCT 5630 K, Spectrasol, Prague, Czech Republic) s dominantní vlnovou délkou 459 nm, který byl umístěn vždy nad chovným boxem, a intenzita tohoto světla byla udržována na 16 luxech. Definovaný světelný režim byl nastaven a dále udržován spínacími hodinami.

Každou březí samici jsem umístila do samostatného boxu, kde byla až do porodu mláďat chována na standartním světelném režimu LD12:12 – tedy od 7:00 do 19:00 světlo o intenzitě 16 luxů a od 19:00 do 7:00 tma (0 luxů). V den porodu jsem mláďata rozdělila do dvou experimentálních skupin. První kontrolní skupinu (LD skupina) jsem dále chovala ve standartních světelných podmínkách LD12:12. Druhou experimentální skupinu jsem chovala v

podmínkách stálého světla, kde byla intenzita udržována na 16 luxech (LL skupina). Obě experimentální skupiny byly v daných podmínkách chovány po dobu 20 dní (do P20), poté byly obě skupiny z důvodu odmaskování přímého vlivu stálého světla umístěny do LD světelného režimu, kde zůstaly 10 dní (do P30), tedy po zbytek experimentu.

### 4.3. Odběr tkání

V den pokusu byla všechna zvířata držena ve stálé tmě. Tkáně jsem odebrala v P30 v devíti časových bodech (CT0, CT3, CT6, CT9, CT12, CT15, CT18, CT21 a CT24). V každém časovém bodě byly odebrány tkáně ze čtyř LD samic a čtyř LL samic, stejně tak ze čtyř LD a čtyř LL samců.

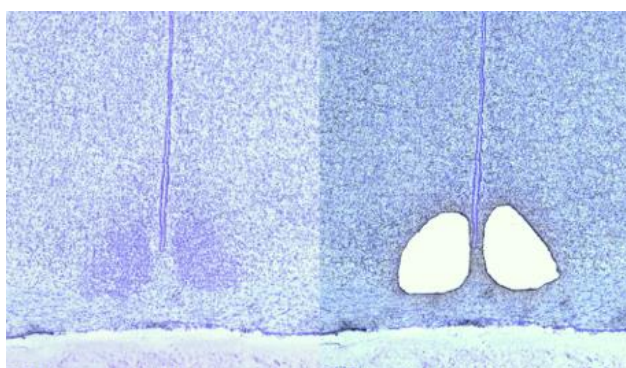
Zvířata jsem uspala intraperitoneální injekcí thiopentalu (50 mg/kg) a následně usmrtila dekapitací. Ihned po usmrcení jsem odebrala hypotalamické bločky obsahující SCN, vzorky hipokampu, frontálního a parietálního kortexu a sítnice. Vzorky tkání jsem umístila do sterilních zkumavek Eppendorf a zmrazila na suchém ledu. Po dokončení odběru daného časového bodu jsem vzorky umístila do mrazicího boxu o teplotě – 80 °C.

### 4.4. Izolace tkání

Pro izolaci RNA z tkáně jsem vzorky dala do sterilních zkumavek Eppendorf, které obsahovaly 1 ml RNAzolu RT. Nejprve bylo nutno vzorky ve zkumavkách rozstříhat na co nejmenší kousky. Dále bylo nutné tkáně homogenizovat po dobu 10 minut a 30 Hz v oscilačním mlýnu Retsch MM200. Poté jsem vzorky stočila na centrifuze (11000 G a 4°C) a díky tomu se mohl odebrat supernatant do nových sterilních zkumavek. Ze získaného supernatantu jsem pomocí Direct-zol<sup>TM</sup> RNA Miniprep Kitu (Zymo Research) izolovala RNA. Supernatant jsem přepipetovala do nové zkumavky, která obsahovala 350 µl ethanolu. Celý získaný objem jsem přepipetovala na kolonku a poté jsem ho dala stočit (1 minuta, RT, 10000g). Po stočení jsem na kolonku přidala 400 µl RNA Wash Bufferu a opět jsem to dala stočit. Podle protokolu jsem smíchala DNase I s DNA Digestion Bufferem. 75 µl tohoto mixu jsem nanasla na kolonku, a inkubovala po dobu 15 minut. Po inkubaci jsem přidala 400 µl Direct-Zol RNA Prewashe a opět jsem to dala stočit (RT, 10000g, 1 minuta). Tento krok se zopakoval. Dále jsem přidala 700 µl RNA Wash Bufferu a opět to bylo potřeba stočit (RT, 10000 g, 2 minuty). Po tomto kroku jsem kolonky přenesla do nové zkumavky a na konec jsme na kolonku přidala ještě 30 µl RNase free vody a znovu se to stočilo (RT, 10000g, 2 minuty).

Izolaci RNA z SCN v hypothalamických bločích předcházelo nařezání bločků na kryokatu na 30  $\mu$ l tlusté koronární řezy, které jsem následně barvila roztokem kresylové violetě a promyla ethanolem tak, aby bylo možné po zaschnutí pomocí laserové mikrodisekce (LMD 6000; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany; obr. č. 5) izolovat vzorky SCN do roztoku RLT pufru. Následně jsem vzorky zmrazila v  $-80^{\circ}\text{C}$  do pokračování izolace.

Izolace byla prováděna pomocí RNeasy Plus Micro Kitu (Qiagen) a byly při ní dodrženy pokyny v protokolu od výrobce. Ke vzorku jsem přidala 65  $\mu$ l 70% ethanolu a pipetováním jsem vše promíchala. Dále jsem vzorek překapala na střed kolonky. Následovala centrifugace (RT, 10000g, 1 minuta). Na kolonku jsem dále přidala 700  $\mu$ l RW1 pufru, opět následovala centrifugace (RT, 10000g, 1 minuta). Dále jsem přidala 500  $\mu$ l RPE pufru, opět následovala centrifugace (RT, 10000g, 1 minuta). Jako jeden z posledních kroků jsem na kolonku přidala 500  $\mu$ l 80% ethanolu a opět následovala centrifugace (RT, 10000g, 2 minuty). Kolonky jsem přendala do nových sběrných zkumavek a dala je centrifugovat (RT, 10000g, 5 minut). Kolonky jsem přendala do nových zkumavek, přidala jsem 13  $\mu$ l DNase free vody a dala jsem to naposledy centrifugovat (RT, 10000g, 2 minuty).



*Obrázek č. 5: Koronální řez SCN před a po laserové mikrodisekci.*

#### 4.5. Reversní transkripce

Následně jsem na nanodropu stanovila koncentrace RNA ve vzorcích a podle nejnižší koncentrace jsem vzorky naředila tak, aby byla stejná koncentrace ve všech vzorcích. Hodnotu vzorku s nejnižší koncentrací jsem vynásobila desetkrát a tuto hodnotu jsem vydělila všemi dalšími získanými hodnotami. Z toho jsem získala objem vzorku. Dále jsem ke každému vzorku dopočítala objem vody tak, aby výsledný objem byl 10  $\mu$ l. K přepsání RNA do cDNA bylo zapotřebí těchto získaných 10  $\mu$ l vzorku smíchat s 10  $\mu$ l mastermixu, který jsem namíchala



podle protokolu od High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu (Thermo Fischer Scientific). Po přepisu jsem vzorky umístila do -20 °C.

Výslednou RNA jsem přepsala do cDNA pomocí Enhanced Avian Reverse Transcriptase eAMV RT (Sigma-Aldrich). U SCN se nejprve musela získaná RNA naředit a to stejným způsobem, jako je zmíněno výše, s tím rozdílem, že celková koncentrace finálního vzorku byla 8 µl. Tento objem jsem smíchala s 10 µl mastermixu, který jsem umíchala dle protokolu.

Nakonec jsem provedla preamplifikaci pomocí TaqMan PreAmp MasterMixu (Thermo Fischer Scientific) z důvodu nízkého výtěžku RNA z SCN vzorků. Vzorky jsem následně uložila do -20°C.

#### 4.6. Kvantitativní RT-qPCR

Vzorky cDNA napipetovala do jamek destičky pro qPCR měření po 2 µl. Pipetování bylo právně ve sterilním boxu. Spolu se vzorkem cDNA byl do jamek napipetováno také 3,1 µl 5xHOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus, 10,3 µl injekční vody a 0,6 µl taqMan Próby požadovaného genu (tab. č. 1). Destičku jsem přelepila optickým adhezivním filmem. Destičku bylo třeba před analýzou jsem ji krátce centrifugovala (1,5 min, 3000g). qPCR měření bylo prováděno v přístroji LightCycler 480 Instrument. Jako první proběhla v přístroji 15 minut dlouhá denaturace při 95 °C, následovala 60 cyklů dlouhá denaturace po 18 s a 95 °C a syntéza DNA po 60 s při 60 °C. Ze získaných hodnot Ct – treshold cycle jsem pomocí metody  $2^{-\Delta\Delta CT}$  determinovala relativní míru exprese zkoumaných genů.

*Tabulka č. 1: Seznam všech použitých prób. V tabulce jsou uvedeny zkratky zkoumaných genů, jaké produkty tyto geny kódují a identifikační kódy příslušných prób. Próby pro *Opn1sw*, *Opn4*, *Opn5*, *Rho* a *Aanat* byly použity pouze v sítnici.*

Zkratka genu	Jméno genu	Kód eseje
<i>Aanat</i>	Aralkylamin N-acetyltransferáza	Rn01461110_m2
<i>Bdnf</i>	Brain-derivedneurothropic factor	Rn02531967_s1
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza	Rn01775763_g1
<i>Grin1</i>	N-metyl D-aspartát 1	Rn01436034_m1
<i>Grin2a</i>	N-metyl D-aspartát 2a	Rn00561341_m1
<i>Grin2b</i>	N-metyl D-aspartát 2b	Rn00680474_m1
<i>Nr1d1</i>	Rev-Erb $\alpha$	Rn01460662_m1
<i>Opn1sw</i>	Opsin 1 – krátkovlnně senzitivní	Rn00578824_m1
<i>Opn4</i>	Opsin 4	Rn00593931_m1
<i>Opn5</i>	Opsin 5	Rn00710997_m1
<i>Per1</i>	Hodinový gen Period 1	Rn01325256_m1
<i>Per2</i>	Hodinový gen Period 2	Rn01427704_m1
<i>Rho</i>	Rhodopsin	Rn00583728_m1
<i>Stat3</i>	Signal transducer and aktivátor of transcription 3	Rn00680715_m1

#### 4.7. Statistické zpracování dat cirkadiánní genové exprese

Analýza získaných hodnot byla provedena v programu Microsoft Office Excel podle  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metody (Livak & Schmittgen, 2001). Jako první bylo zapotřebí vypočítat průměr z naměřených tripletů pro každý vzorek. Pro získání  $\Delta Ct$  z průměrných hodnot tripletů bylo zapotřebí v rámci každého vzorku odečíst Ct housekeeping genu Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (*Gapdh*) od Ct zkoumaného genu. Tento krok se musel opakovat pro všechny geny. Dále bylo zapotřebí získat  $\Delta\Delta Ct$ , což se udělalo tak, že se od každé hodnoty vzorku  $\Delta CT$  odečetla nejnižší nalezená hodnota vzorku  $\Delta Ct$  ve stejném genu. Tento postup se také musel opakovat pro všechny geny. Nakonec bylo potřeba vypočítat relativní hodnotu exprese zkoumaných genů pomocí vzorce  $2^{-\Delta\Delta CT}$  pro každou hodnotu získanou z předchozího kroku.

Finální zpracování hodnot probíhalo v programu GraphPad Prism 8, kde byla provedena analýza dvoucestné a trojcestné variance (ANOVA) a kosinorová analýza.

Kosinorová analýza popisuje vlastnosti cirkadiánního rytmu, srovnává testovaný profil genové exprese s nulovou hypotézou definovanou jako horizontální čára ( $H_0$ ). Podle vzorce

$$Y = \frac{\text{mesor} + (\text{amplituda} * -\cos(2 * p * (x - \text{akrofáze}))}{\text{vlnová délka}}$$

prokládá tato analýza poskytnutými hodnotami sinusoidu kosinorové křivky. Hodnota mesoru je průměr mezi maximální a minimální hodnotou proložené sinusoidy. Amplituda popisuje hodnotu mezi maximálním bodem sinusoidy a hodnotou mesoru. Mesor i amplituda je udávána v hodnotách relativní mRNA hladiny. Akrofáze kosinorové analýzy je časový bod, ve kterém kosinorová křivka dosáhla maxima při konstantní vlnové délce rytmu 24 hodin. Akrofáze je udávána v hodinách cirkadiánního času CT. Hodnota P udává míru významnosti rozdílu mezi zkoumanými hodnotami. Rozdíl mezi daty byl označen jako signifikantní, pokud analýza vyhodnotila hodnotu P menší než 0,05. Signifikantní hodnoty jsou v tabulkách a grafech vyznačeny tučně.

Přítomnost rytmu v genové expresi je potvrzena nebo zamítnuta kosinorovou analýzou. Pokud analýza odmítne nulovou hypotézu na úrovni  $P < 0,05$ , tak je rytmicita exprese daného genu potvrzena. Tento případ je v grafu vyznačen plnou čarou. Pokud hodnota signifikantní není, tak je to v grafu vyznačeno přerušovanou čarou.

Rozdíl mezi hodnotami LL a LD skupiny popisuje test dvoucestná ANOVA. Opět byl rozdíl označen jako signifikantní, pokud  $P < 0,05$ . Pokud hodnota vyšla signifikantní, tak je v grafu tučně vyznačena.

Trojcestná ANOVA srovnává čas x pohlaví x skupinu. Signifikantní byl opět výsledek  $P < 0,05$ .

#### 4.8. Záznam pohybové aktivity

Jedenáct samců z každé skupiny bylo samostatně umístěno do chovných boxů, kde byli v klasických světelných podmínkách střídání světla a tmy – LD-12:12 chováni po dobu deseti dnů a následně byli přemístěni do podmínek stálé tmy – DD (0 luxů), kde byli chováni po dobu dalších 14 dnů. Během celého experimentu měla zvířata přístup k potravě i vodě *ad libitum*. Zvířata byla rozdělena do dvou experimentálních skupin. První skupinu tvořila zvířata, která byla od narození do P20 chována na stálém světle – LL skupina, a druhá skupina, která sloužila jako skupina kontrolní, zahrnovala zvířata odchovaná za klasických světelných podmínek – LD skupina. Během DD podmínek bylo zabráněno jakémukoliv vstupu bílého světla do chovné místnosti. Při nutných pracích v této místnosti bylo svíceno pouze červeným světlem, což je světlo, které je pro potkany biologicky neaktivní.

Nad každým chovným boxem byl umístěn infračervený detektor pohybu Mini-Mitter VitalView od firmy Starr (Oregon, USA). Tento detektor nepřetržitě monitoroval pohyb zvířat po celou dobu experimentu. Data sesbíraná z detektoru byla nahrávána v programu Vitalview. Po skončení měření byla data zpracována a vyhodnocena v programu ClockLab Analysis (Verse 6, Actimetrics, Willette IL, USA).

#### 4.9. Statistické zpracování dat lokomoční aktivity

Desetidenní záznam lokomoční aktivity byl analyzován v programu ClockLab. Pomocí  $X^2$  periodogramu byla stanovena délka cirkadiánní periody a relativní amplituda rytmu volného běhu u obou skupin zvířat, a neparametrický faktor mezidenní stability, který vypovídá o schopnosti cirkadiánního systému udržet vnitřní periodu a amplitudu. Hodnoty mezi skupinami byly porovnávány Studentovým t testem a F testem byla porovnána také míra variability v jednotlivých skupinách.

## 5. Výsledky

### 5.1. Výsledky měření cirkadiálních rytmů exprese

#### 5.1.1. Exprese genů v SCN

Zamítnutím nulové hypotézy (H<sub>0</sub>) kosinorovou analýzou je potvrzena rytmicitata exprese jednotlivých genů v SCN. Hodnoty získané kosinorovou analýzou jsou uvedeny v tabulce č. 2. Hodnoty, které potvrzují rytmicitatu exprese příslušného genu, jsou v tabulce zvýrazněny tučně (tab. č. 2).

**Tabulka č. 2:** Hodnoty získané kosinorovou analýzou naměřené v SCN u samců a samic a ve skupině, kde byli samci a samice spojeny.

	samci		samice		samci + samice	
	LD	LL	LD	LL	LD	LL
<i>Per1</i>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1972	<b>0,0006</b>	0,1155	<b>&lt;0,0001</b>	0,0677
<i>Per2</i>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0031</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0065</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>Nr1d1</i>	<b>0,0012</b>	0,5997	<b>0,0013</b>	0,1489	<b>&lt;0,0001</b>	0,3237
<i>Bdnf</i>	0,8720	<b>&lt;0,0001</b>	0,1512	0,1299	0,8617	<b>0,0071</b>
<i>Stat3</i>	<b>0,0033</b>	0,6848	<b>0,0460</b>	0,6505	<b>0,0001</b>	0,4333
<i>Grin1</i>	<b>0,0009</b>	0,0512	<b>0,0386</b>	0,4994	<b>0,0007</b>	0,1378
<i>Grin2b</i>	<b>0,0143</b>	0,0632	<b>0,0002</b>	<b>0,0265</b>	<b>0,0002</b>	0,1417

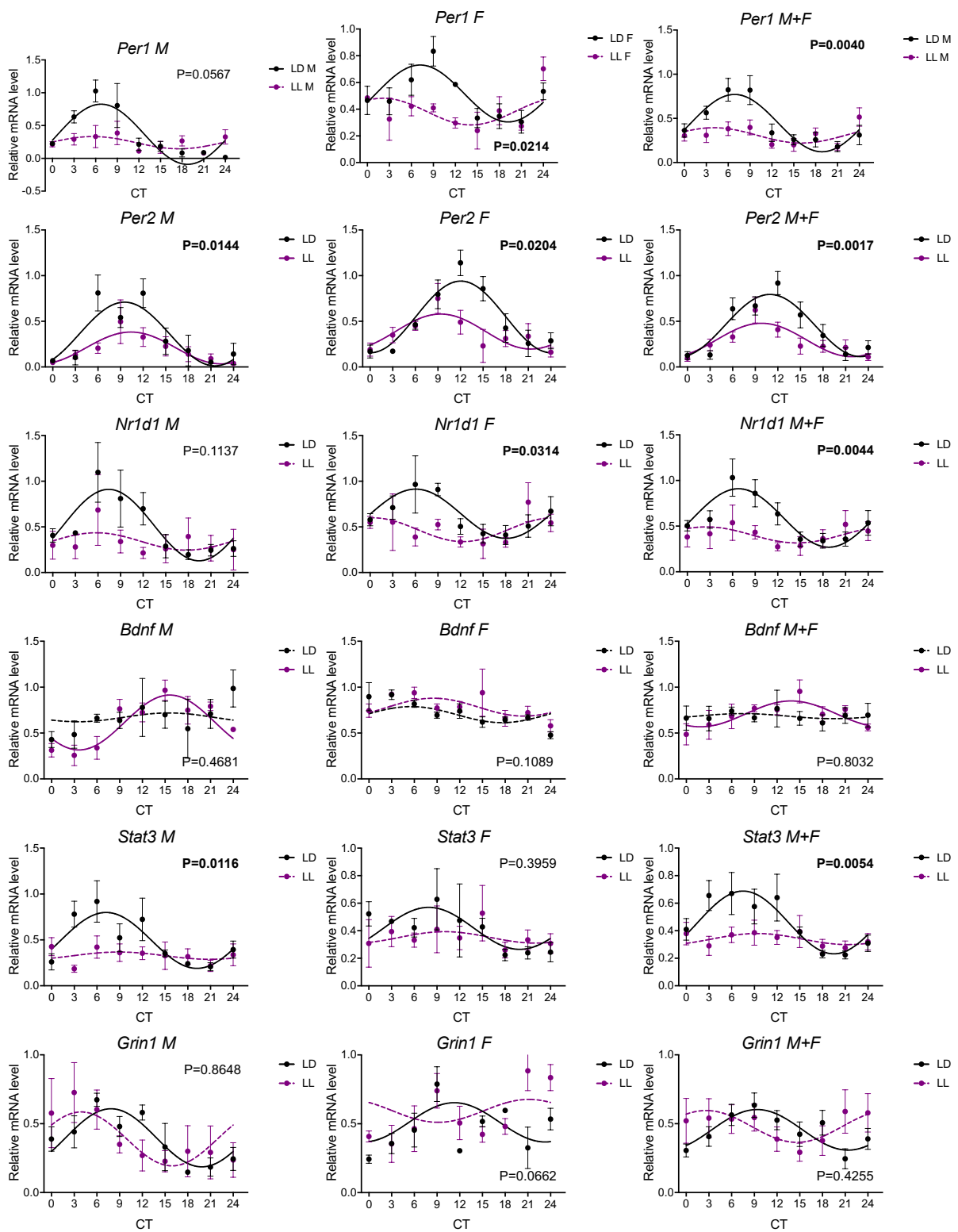
U genů, jejichž rytmická exprese byla potvrzena, jsem pomocí kosinorové analýzy vypočítala hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze rytmu zvlášť pro samce a samice, a dále pro skupinu, ve které byly hodnoty samců a samic spojeny. Mesor, neboli průměrná hodnota rytmu, a amplituda rytmu jsou uvedeny v hodnotách relativní hladiny mRNA. Akrofáze, neboli doba maximální hodnoty rytmu, je stanovena v hodinách cirkadiálního času CT. Hodnota P je v tabulce vyznačena tučně v případě, že  $P > 0,05$  a rozdíly mezi oběma skupinami jsou tedy signifikantní (tab č. 3).

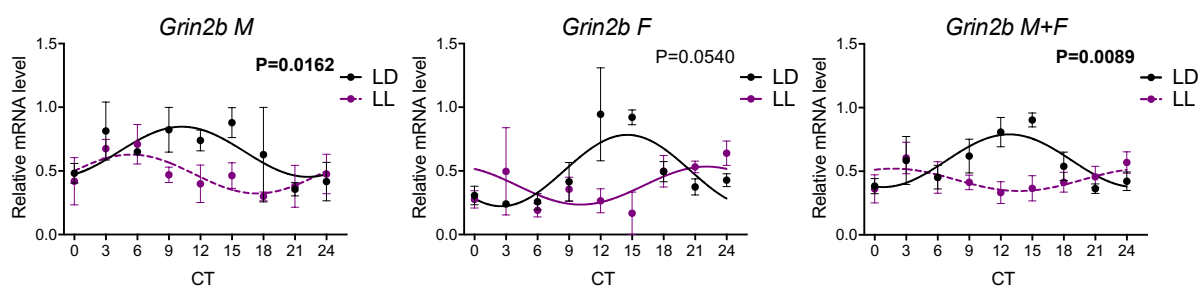
**Tabulka č. 3:** Hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze u rytmů zkoumaných genů v SCN získané kosinorovou analýzou kontrolní LD skupiny a LL skupiny zvířat samců, samic a samců + samic.

		samci			samice			samci + samice		
		LD	LL	P hod.	LD	LL	P hod.	LD	LL	P hod.
<b>Per1</b>	mesor	0,3677			0,5176			0,4466		
	amplituda	0,4582	bez	bez	0,2131	bez	bez	0,3243	bez	bez
	akrofáze	6,7630	rytmu	rytmu	7,1980	rytmu	rytmu	6,8780	rytmu	rytmu
<b>Per2</b>	mesor	0,3609	0,2082	<b>0,0090</b>	0,5482	0,3881	<b>0,0084</b>	0,4540	0,2958	<b>0,0005</b>
	amplituda	0,3486	0,1743	<b>0,0277</b>	0,3921	0,1916	<b>0,0144</b>	0,3404	0,1829	<b>0,0091</b>
	akrofáze	9,5240	10,3800	0,5503	12,0400	9,3590	0,0585	10,9500	9,8290	0,3047
<b>Nr1d1</b>	mesor	0,5199			0,6440			0,5897		
	amplituda	0,3910	bez	bez	0,2694	bez	bez	0,3201	bez	bez
	akrofáze	7,4220	rytmu	rytmu	6,0560	rytmu	rytmu	6,7880	rytmu	rytmu
<b>Bdnf</b>	mesor		0,6150					0,7090		
	amplituda	bez	0,2990	bez	bez	bez	bez	0,1408	bez	bez
	akrofáze	rytmu	15,6200	rytmu	rytmu	rytmu	rytmu	13,8500	rytmu	rytmu
<b>Stat3</b>	mesor	0,4943			0,4174			0,4599		
	amplituda	0,3045	bez	bez	0,1524	bez	bez	0,2280	bez	bez
	akrofáze	7,2080	rytmu	rytmu	7,9170	rytmu	rytmu	7,5070	rytmu	rytmu
<b>Grin1</b>	mesor	0,3977			0,5106			0,4556		
	amplituda	0,2109	bez	bez	0,1425	bez	bez	0,1474	bez	bez
	akrofáze	7,8630	rytmu	rytmu	11,2900	rytmu	rytmu	9,3780	rytmu	rytmu
<b>Grin2b</b>	mesor	0,6505			0,5030	0,3848	<b>0,0414</b>	0,5828		
	amplituda	0,1969	bez	bez	0,2802	0,1492	0,0950	0,2068	bez	bez
	akrofáze	10,2300	rytmu	rytmu	14,5500	22,0900	<b>0,0179</b>	12,8000	rytmu	rytmu

Obrázek č. 6 ukazuje expresní profily genů v SCN s vyznačením prokázané rytmicity a výsledky dvoucestné ANOVA. Test dvoucestná ANOVA vyhodnotil jako signifikantní rozdíly v expresi genu *Per1* u samic ( $P=0,0214$ ) a u smíšené skupiny M+F ( $P=0,0040$ ). Dále signifikantní rozdíly vyšly v expresi genu *Per2* jak u samců ( $P=0,0144$ ), tak u samic ( $0,0204$ ) a také u smíšené skupiny ( $P=0,0017$ ). V expresi genu *Nr1d1* vyšly signifikantní rozdíly u samic ( $P=0,0314$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,0044$ ). V expresi genu *Bdnf* vyšly signifikantní rozdíly u samců ( $P=0,0116$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,0054$ ). V expresi genu *Grin2b* vyšly signifikantní rozdíly také u samců ( $P=0,0162$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,089$ ).

Test dvoucestná ANOVA vyhodnotil jako nesignifikantní rozdíl v expresi genu *Per1* u samců ( $P=0,0567$ ). Dále byl vyhodnocen jako nesignifikantní rozdíl exprese genu *Nr1d1* u samic ( $P=0,1137$ ). V expresi genu *Bdnf* byly vyhodnoceny rozdíly jako nesignifikantní jak u samců ( $P=0,46981$ ), tak u samic ( $P=0,1089$ ) a stejně tak u smíšené skupiny ( $P=0,8032$ ). V expresi genu *Stat3* byly jako nesignifikantní vyhodnoceny rozdíly u samic ( $P=0,3959$ ). V expresi genu *Grin1* byly rozdíly vyhodnoceny jako nesignifikantní u samců ( $P=0,8648$ ) a i u samic ( $P=0,0662$ ), stejně tak u smíšené skupiny ( $P=0,4255$ ). U *Grin2b* byly jako nesignifikantní vyhodnoceny pouze výsledky u samic ( $P=0,0540$ ).





**Obrázek č. 6:** Grafy časových profilů exprese vybraných genů v SCN u samců (M), samic (F) a u samců + samic (M+F). Grafy zobrazují kosinorovou křivku pro kontrolní LD skupinu a pro LL skupinu, proloženou průměry relativních hladin mRNA vybraných genů ± SEM v cirkadiálním čase 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 a 24. Hodnoty kontrolní LD skupiny jsou zobrazeny černě, hodnoty LL skupiny fialově. Příslušná sinusoida je v grafu vyznačena přerušovaně, pokud byla statistickými testy zamítnuta rytmicita exprese. Do grafů je dále vložena P hodnota, která byla určena testem dvoucestná ANOVA. Tento test udává míru rozdílu mezi všemi hodnotami obou skupin. Signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) byl vyznačen tučně.

Test trojcestné ANOVA nevyhodnotil žádný výsledek jako signifikantní – *Per1* ( $P=0,5714$ ), *Per2* ( $P=0,1382$ ), *Nr1d1* ( $P=0,9668$ ), *Bdnf* ( $P=0,4666$ ), *Stat3* ( $P=0,4001$ ), *Grin1* ( $P=0,4613$ ) a *Grin2b* ( $P=0,3745$ ).

### 5.1.2. Exprese genů v hipokampu

Zamítnutím nulové hypotézy ( $H_0$ ) kosinorovou analýzou je potvrzena rytmicita exprese jednotlivých genů v hipokampu. Hodnoty získané kosinorovou analýzou jsou uvedeny v tabulce č. 4. Hodnoty, které potvrzují rytmicitu exprese příslušného genu, jsou v tabulce zvýrazněny tučně.

**Tabulka č. 4:** Hodnoty získané kosinorovou analýzou naměřené v hipokampu u samců a samic a ve skupině, kde byli samci a samice spojeni v jedné skupině.

	samci		samice		samci+samice	
	LD	LL	LD	LL	LD	LL
<i>Per1</i>	0,2340	0,5296	<b>0,0214</b>	0,1346	<b>0,0389</b>	0,0844
<i>Per2</i>	<b>0,0075</b>	0,1952	<b>0,0381</b>	0,0535	0,2209	0,0701
<i>Nr1d1</i>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1855	<b>0,0007</b>	<b>0,0003</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>Bdnf</i>	<b>0,0005</b>	0,0982	0,3102	0,2776	0,0755	0,0682
<i>Stat3</i>	<b>0,0008</b>	0,1634	0,0839	0,6237	0,1123	0,3096
<i>Grin1</i>	<b>0,0035</b>	0,0540	<b>0,0351</b>	0,4372	0,2902	0,0899
<i>Grin2a</i>	<b>0,0006</b>	0,3610	<b>0,0230</b>	0,7662	0,2008	0,6134
<i>Grin2b</i>	0,0520	0,0865	0,3575	0,3632	0,3683	0,6415

U genů, jejichž rytmická exprese byla potvrzena, jsem pomocí kosinorové analýzy vypočítala hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze rytmu u samců a samic, a dále pro skupinu, ve které byly hodnoty samců a samic spojeni. Mesor (průměrná hodnota rytmu) a amplituda rytmu jsou uvedeny v hodnotách relativní hladiny mRNA. Akrofáze, což doba maximální hodnoty rytmu, je stanovena v hodinách cirkadiálního času CT. Hodnota P je v tabulce vyznačena tučně v případě, že  $P > 0,05$  a rozdíl mezi skupinami je tedy signifikantní (tab. č. 5).

**Tabulka č. 5:** Hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze u rytmů zkoumaných genů v hipokampu získané kosinorovou analýzou kontrolní LD skupiny a LL skupiny zvířat samců, samic a samců + samic.

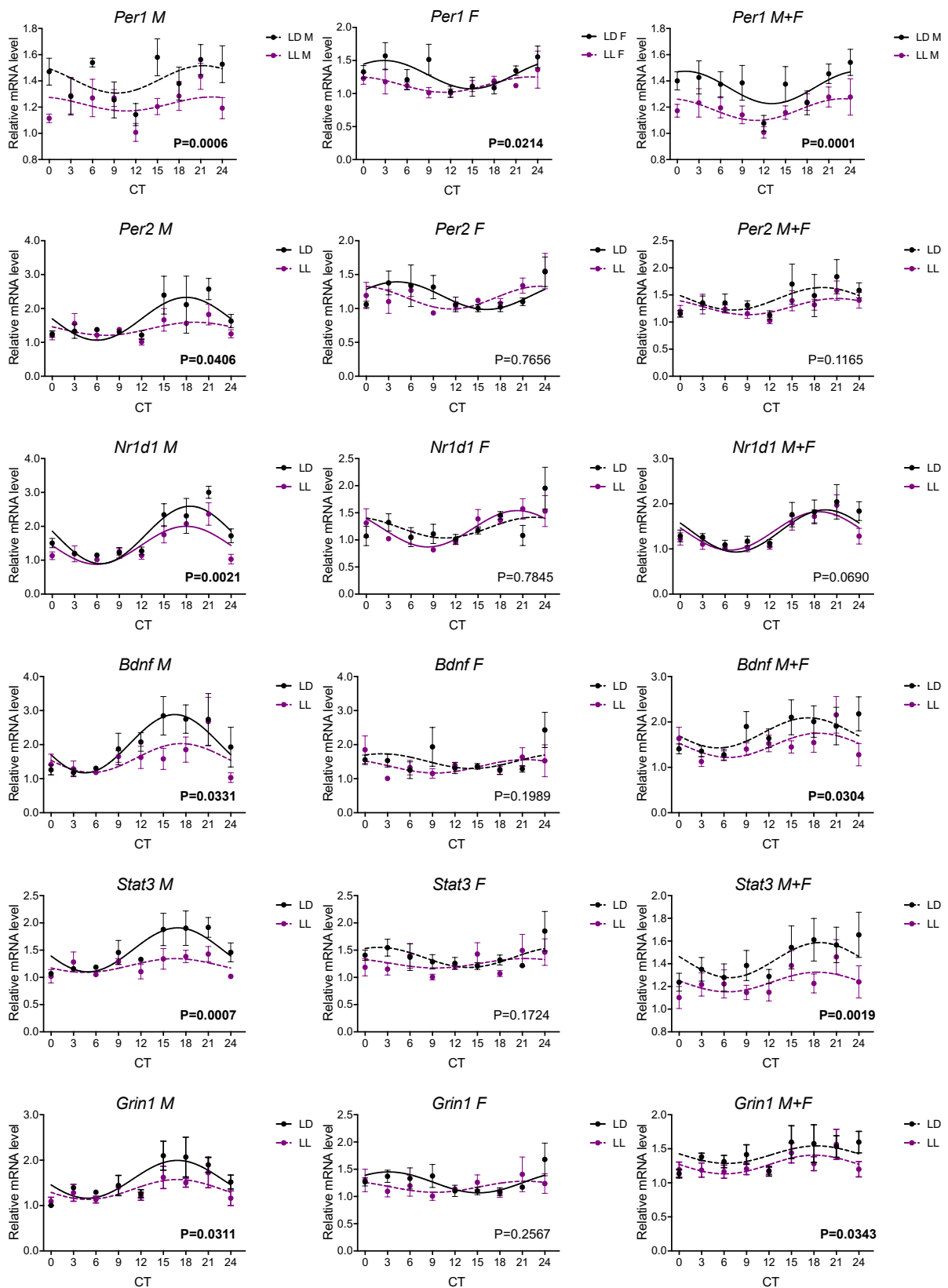
		samci			samice			samci + samice		
		LD	LL	P hod.	LD	LL	P hod.	LD	LL	P hod.
<b>Per1</b>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	1,2860 0,2140 2,8370	bez rytmu	bez rytmu	1,3500 0,1234 25,1000	bez rytmu	bez rytmu
<b>Per2</b>	mesor amplituda akrofáze	1,6970 0,6321 17,9900	bez rytmu	bez rytmu	1,1890 0,2035 28,1400	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<b>Nr1d1</b>	mesor amplituda akrofáze	1,7460 0,8477 18,5100	1,4410 0,5607 17,9600	<b>0,0093</b> 0,0954 0,5266	bez rytmu	1,2050 0,3351 20,2600	bez rytmu	1,4730 0,4576 19,3200	1,3270 0,4277 18,7600	0,0927 0,8148 0,5751
<b>Bdnf</b>	mesor amplituda akrofáze	2,0280 0,8556 16,5200	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<b>Stat3</b>	mesor amplituda akrofáze	1,5050 0,4038 16,9200	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<b>Grin1</b>	mesor amplituda akrofáze	1,5780 0,4167 16,8800	bez rytmu	bez rytmu	1,2590 0,1916 27,1500	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<b>Grin2a</b>	mesor amplituda akrofáze	1,4860 0,5237 17,2200	bez rytmu	bez rytmu	1,3070 0,2350 26,9300	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<b>Grin2b</b>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu

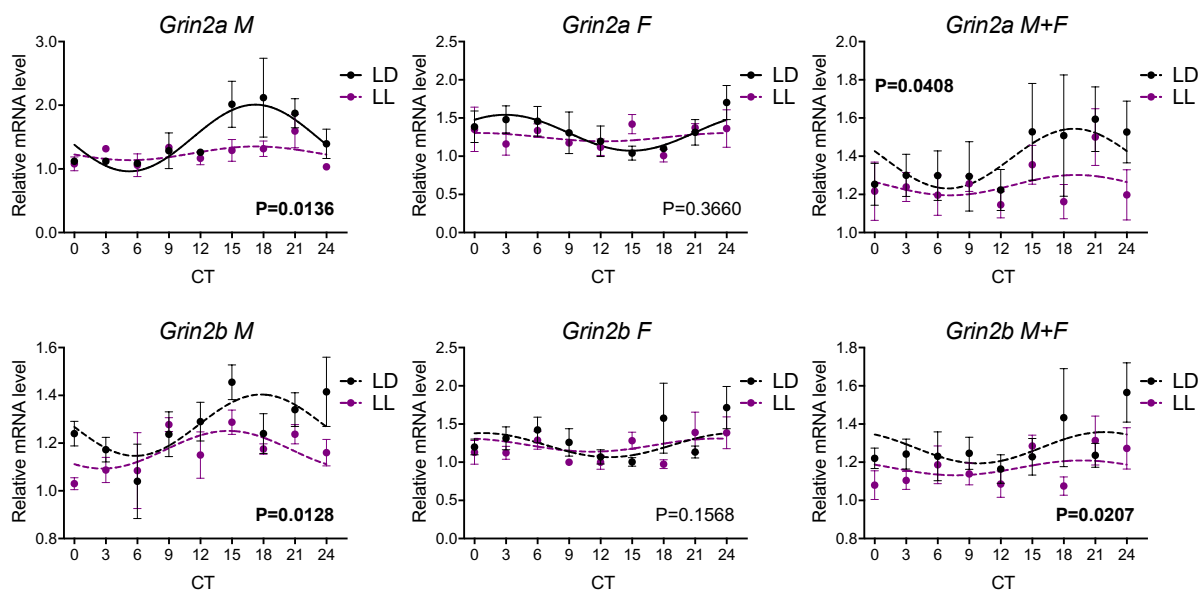
Obrázek č. 7 ukazuje expresní profily genů v hipokampu s vyznačením prokázané rytmicity a výsledky dvoucestné ANOVA. Test dvoucestná ANOVA vyhodnotil rozdíly měřené v hipokampu jako signifikantní v expresi genů *Per1* u samců ( $P=0,0006$ ), u samic ( $P=0,0214$ ) a i u smíšené skupiny ( $P=0,0001$ ). Dále vyšla signifikantní exprese genu *Per2* u samců ( $P=0,0406$ ). V expresi genu *Nr1d1* vyšel signifikantní rozdíl opět jen u samců ( $P=0,0021$ ). Dále test vypočítal signifikantní rozdíl v expresi genu *Bdnf* u samců ( $P=0,0331$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,0304$ ). Expresse genu *Stat3* vyšla signifikantně rozdílná u samců ( $P=0,0007$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,0019$ ). Expresse genu *Grin1* je signifikantně rozdílná u samců ( $P=0,0311$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,0343$ ). V expresi genu *Grin2a* vyšly signifikantní rozdíly pro skupiny samců ( $P=0,0136$ ) a pro smíšené skupiny ( $P=0,0408$ ). V expresi genu *Grin2b* vyšly signifikantně rozdíly u samců ( $P=0,0128$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,0207$ ).

Test dvoucestná ANOVA vyhodnotil jako nesignifikantní rozdíly měření v hipokampu v expresi genu *Per2* u samců ( $P=0,7656$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,1165$ ). Dále nesignifikantní rozdíly vyšly v expresi genu *Nr1d1* u samců ( $P=0,7845$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,0690$ ). Dále vycházely nesignifikantně rozdíly u samic jak v expresi genu *Bdnf* ( $P=0,1989$ ), tak v expresi



genu *Stat3* ( $P=0,1724$ ), v expresi genu *Grin1* ( $P=0,2567$ ), v expresi genu *Grin2a* ( $P=0,3660$ ) a také v expresi genu *Grin2b* ( $P=0,1568$ ).





**Obrázek č. 7:** Grafy časových profilů exprese vybraných genů v hipokampu u samců (M), samic (F) a u samců + samic (M+F). Grafy zobrazují kosinorovou křivku pro kontrolní LD skupinu a pro LL skupinu, proloženou průměry relativních hladin mRNA vybraných genů ± SEM v cirkadiálním čase 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 a 24. Hodnoty kontrolní LD skupiny jsou zobrazeny černě, hodnoty LL skupiny fialově. Příslušná sinusoida je v grafu vyznačena přerušovaně, pokud byla statistickými testy zamítnuta rytmicita exprese. Do grafů je dále vložena P hodnota, která byla určena testem dvoucestná ANOVA. Tento test udává míru rozdílu mezi všemi hodnotami obou skupin. Signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) byl vyznačen tučně.

Test trojcestné ANOVA nevyhodnotil žádný výsledek jako signifikantní – *Per1* ( $P=0,2394$ ), *Per2* ( $P=0,2230$ ), *Nr1d1* ( $P=0,1195$ ), *Bdnf* ( $P=0,3670$ ), *Stat3* ( $P=0,1512$ ), *Grin1* ( $P=0,5502$ ), *Grin2a* ( $P=0,3168$ ) a *Grin2b* ( $P=0,0754$ ).

### 5.1.3. Exprese genů ve frontálním kortexu

Zamítnutím nulové hypotézy ( $H_0$ ) kosinorovou analýzou je potvrzena rytmicita exprese jednotlivých genů ve frontální kůře. Hodnoty získané kosinorovou analýzou jsou uvedeny v tabulce č. 6. Hodnoty, které potvrzují rytmicitu exprese příslušného genu, jsou v tabulce zvýrazněny tučně.

**Tabulka č. 6:** Hodnoty získané kosinorovou analýzou naměřené ve frontálním kortexu u samců a samic a ve skupině, kde byli samci a samice spojeni v jedné skupině.

	samci		samice		samci+samice	
	LD	LL	LD	LL	LD	LL
<i>Per1</i>	<b>0,0027</b>	0,9508	<b>0,0002</b>	<b>0,0118</b>	0,2787	0,3759
<i>Per2</i>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,0487</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>Nr1d1</i>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0004</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>Bdnf</i>	<b>0,0004</b>	<b>0,0031</b>	0,1944	0,3456	<b>0,0425</b>	0,0629
<i>Stat3</i>	0,3099	0,3513	0,0541	<b>0,0321</b>	0,0716	0,9663
<i>Grin1</i>	0,0885	0,5339	0,1786	<b>0,0458</b>	0,1648	0,1734
<i>Grin2a</i>	<b>0,0022</b>	0,2307	0,0503	<b>0,0406</b>	0,0658	0,5196
<i>Grin2b</i>	0,1177	<b>0,0412</b>	<b>0,0458</b>	<b>0,0107</b>	0,1068	0,2650

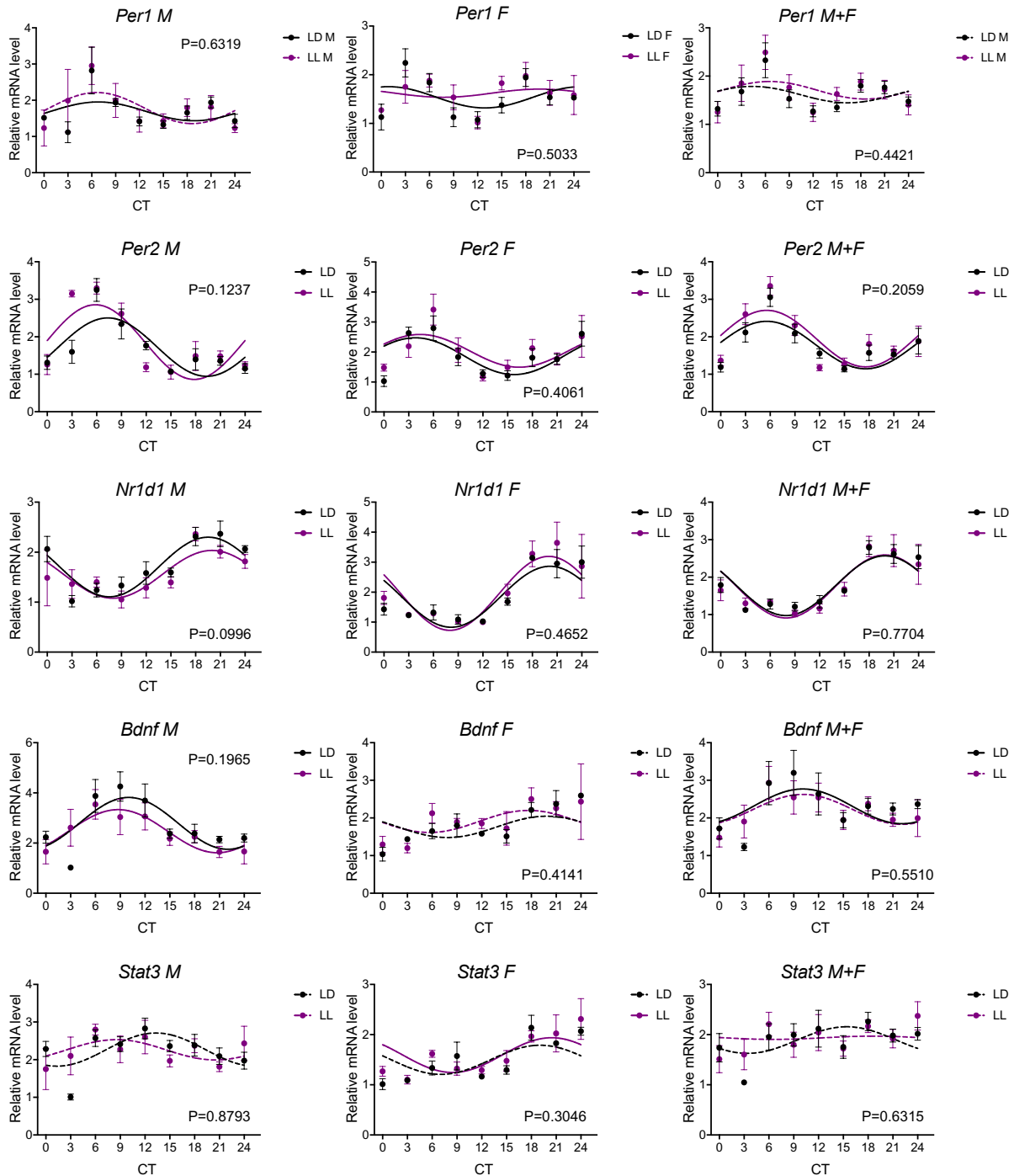
U genů, jejichž rytmická exprese byla potvrzena, jsem pomocí kosinorové analýzy vypočítala hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze rytmu u samců a samic, a dále pro skupinu, ve které byly hodnoty samců a samic spojeny. Mesor, neboli průměrná hodnota rytmu, a amplituda rytmu jsou uvedeny v hodnotách relativní hladiny mRNA. Akrofáze, neboli doba maximální hodnoty rytmu, je stanovena v hodinách cirkadiálního času CT. Hodnota P je v tabulce vyznačena tučně v případě, že  $P > 0,05$  a rozdíl mezi skupinami je tedy signifikantní (tab. č. 7).

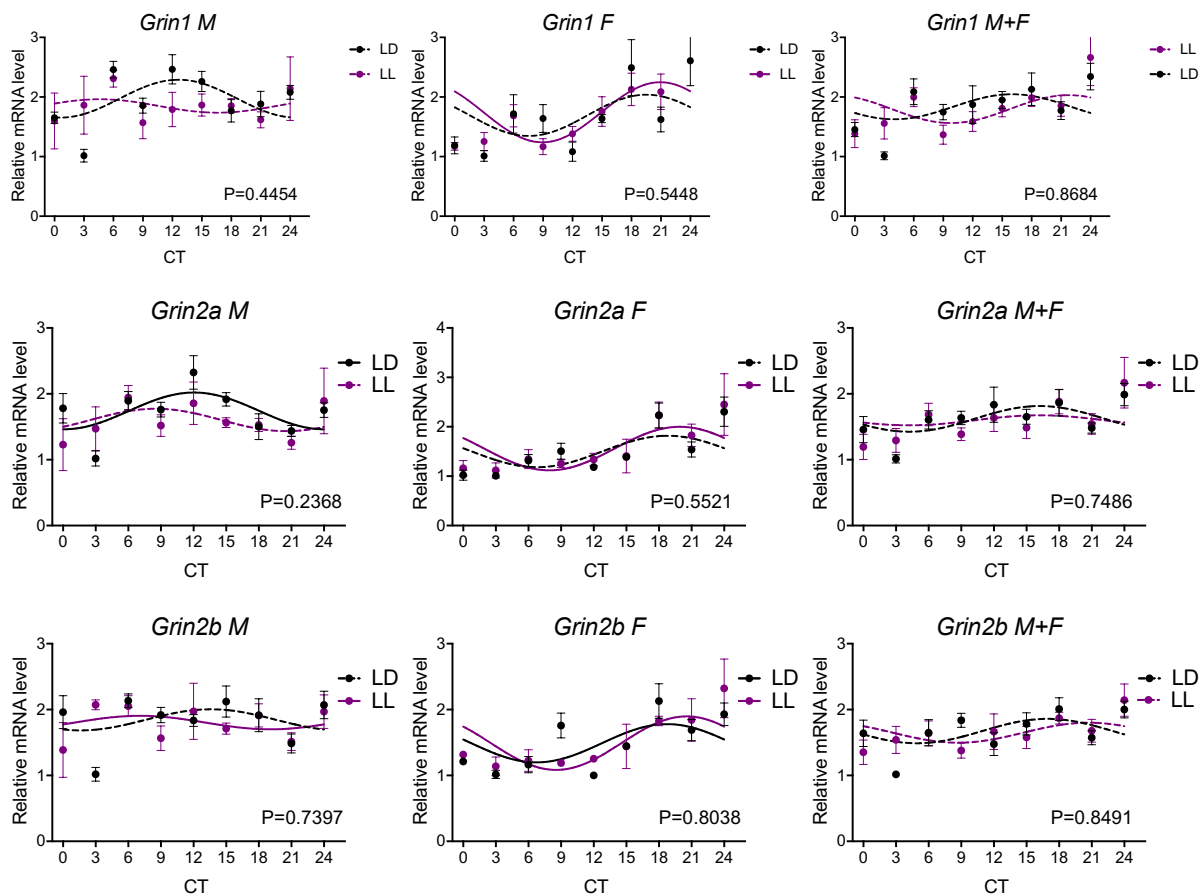
**Tabulka č. 7:** Hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze u rytmů zkoumaných genů ve frontálním kortexu získané kosinorovou analýzou kontrolní LD skupiny a LL skupiny zvířat samců, samic a samců + samic.

		samci			samice			samci + samice		
		LD	LL	P hod.	LD	LL	P hod.	LD	LL	P hod.
<b>Per1</b>	mesor	1,6930			1,5360	1,6210	0,5149			
	amplituda	0,2597	bez	bez	0,2184	0,0839	0,4620	bez	bez	bez
	akrofáze	6,8280	rytmu	rytmu	0,8899	19,7400	0,5436	rytmu	rytmu	rytmu
<b>Per2</b>	mesor	1,7240	1,8580	0,3752	1,8620	2,0400	0,3661	1,7860	1,9460	0,2063
	amplituda	0,7786	0,9958	0,3285	0,6128	0,5461	0,8125	0,6384	0,7548	0,5322
	akrofáze	7,3550	5,8470	0,0961	3,7940	4,3900	0,7415	5,9380	5,3150	0,5116
<b>Nr1d1</b>	mesor	1,7040	1,5570	0,1491	1,8470	1,9600	0,5740	1,7740	1,7510	0,8463
	amplituda	0,5965	0,4778	0,4214	1,0160	1,2330	0,4562	0,7977	0,8393	0,8078
	akrofáze	19,5300	19,9900	0,6499	20,1500	20,0000	0,8809	19,8600	19,9900	0,8648
<b>Bdnf</b>	mesor	2,7860	2,4740	0,1843				2,3110		
	amplituda	1,0320	0,8586	0,5949	bez	bez	bez	0,4591	bez	bez
	akrofáze	10,0300	8,7430	0,3468	rytmu	rytmu	rytmu	10,3900	rytmu	rytmu
<b>Stat3</b>	mesor					1,5920				
	amplituda	bez	bez	bez	bez	0,3459	bez	bez	bez	bez
	akrofáze	rytmu	rytmu	rytmu	rytmu	20,4600	rytmu	rytmu	rytmu	rytmu
<b>Grin1</b>	mesor					1,7440				
	amplituda	bez	bez	bez	bez	0,5038	bez	bez	bez	bez
	akrofáze	rytmu	rytmu	rytmu	rytmu	20,9400	rytmu	rytmu	rytmu	rytmu
<b>Grin2a</b>	mesor	1,7410				1,5600				
	amplituda	0,2791	bez	bez	bez	0,4405	bez	bez	bez	bez
	akrofáze	12,0500	rytmu	rytmu	rytmu	19,9200	rytmu	rytmu	rytmu	rytmu
<b>Grin2b</b>	mesor		1,8030		1,4900	1,4910	0,9902			
	amplituda	bez	0,1024	bez	0,2900	0,4059	0,4949	bez	bez	bez
	akrofáze	rytmu	7,0710	rytmu	18,7500	20,5400	0,3405	rytmu	rytmu	rytmu

Obrázek č. 8 ukazuje expresní profily genů ve frontální kůře s vyznačením prokázané rytmicity a výsledky dvoucestné ANOVA. Test dvoucestná ANOVA vyhodnotil všechny rozdíly měřené ve frontálním kortexu jako nesignifikantní. A to konkrétně v expresi genu *Per1* u samců ( $P=0,6319$ ), u samic ( $P=0,5033$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,4421$ ), v expresi genu *Per2* u samců ( $P=0,1237$ ), u samic ( $P=0,4061$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,2059$ ), v expresi genu *Nr1d1* u samců ( $P=0,0996$ ), u samic ( $P=0,4652$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,7704$ ), v expresi genu *Bdnf* u samců ( $P=0,1965$ ), u samic ( $P=0,4141$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,5510$ ). Dále v expresi genu *Stat3* u samců ( $P=0,8793$ ), u samic ( $P=0,3046$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,6315$ ), v expresi genu *Grin1* u samců ( $P=0,4454$ ), u samic ( $P=0,5448$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,8684$ ),

v expresi genu *Grin2a* u samců (P=0,2368), u samic (P=0,5521) a u smíšené skupiny (P=0,7486) a v expresi genu *Grin2b* u samců (P=0,7397), u samic (P=0,8038) a u smíšené skupiny (P=0,8491).





**Obrázek č. 8:** Grafy časových profilů exprese vybraných genů ve frontálním kortexu u samců (M), samic (F) a u samců + samic (M+F). Grafy zobrazují kosinorovou křivku pro kontrolní LD skupinu a pro LL skupinu, proloženou průměry relativních hladin mRNA vybraných genů ± SEM v cirkadiánním čase 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 a 24. Hodnoty kontrolní LD skupiny jsou zobrazeny černě, hodnoty LL skupiny fialově. Příslušná sinusoida je v grafu vyznačena přerušovaně, pokud byla statistickými testy zamítnuta rytmicita exprese. Do grafů je dále vložena P hodnota, která byla určena testem dvoucestná ANOVA. Tento test udává míru rozdílu mezi všemi hodnotami obou skupin. Signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) byl vyznačen tučně.

Test trojcestné ANOVA nevyhodnotil žádný výsledek jako signifikantní – *Per1* ( $P=0,5669$ ), *Per2* ( $P=0,0895$ ), *Nr1d1* ( $P=0,7949$ ), *Bdnf* ( $P=0,2470$ ), *Stat3* ( $P=0,2961$ ), *Grin1* ( $P=0,5268$ ), *Grin2a* ( $P=0,8185$ ) a *Grin2b* ( $P=0,2337$ ).

#### 5.1.4. Exprese genů v sítnici

Zamítnutím nulové hypotézy ( $H_0$ ) kosinorovou analýzou je potvrzena rytmicita exprese jednotlivých genů v sítnici. Měření bylo prováděno u hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Nr1d1*, *Bdnf*, *Stat3* a dále u tkáňově specifických genů *Aanat*, *Opn1sw*, *Opn4*, *Opn5* a *Rho*. Hodnot získané kosinorovou analýzou jsou uvedeny v tabulce č. 8. Hodnoty, které potvrzují rytmicitu exprese příslušného genu, jsou v tabulce zvýrazněny tučně.

**Tabulka č. 8:** Hodnoty získané kosinorovou analýzou naměřené v sítnici u samců a samic a ve skupině, kde byli samci a samice spojeni do jedné skupiny.

	samci		samice		samci+samice	
	LD	LL	LD	LL	LD	LL
<i>Per1</i>	0,2171	0,2810	0,3183	0,8952	0,0651	0,3432
<i>Per2</i>	0,9345	0,3490	0,1086	0,1434	0,3291	0,0540
<i>Nr1d1</i>	0,7714	0,5888	0,3744	0,3822	0,7377	0,8734
<i>Bdnf</i>	<b>0,0269</b>	0,3594	0,1104	0,1966	0,0946	0,4891
<i>Stat3</i>	0,0708	0,3584	0,7728	0,4732	0,5334	0,3326
<i>Aanat</i>	0,0644	<b>0,0274</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<i>Opn1sw</i>	<b>0,0442</b>	0,2429	0,4784	0,3684	0,1290	0,1876
<i>Opn4</i>	0,2307	0,0764	<b>0,0212</b>	0,1179	<b>0,0065</b>	<b>0,0078</b>
<i>Opn5</i>	0,1254	0,4619	0,8060	0,2171	0,2279	0,1276
<i>Rho</i>	0,0549	0,2934	0,9972	0,8242	0,4455	0,6553

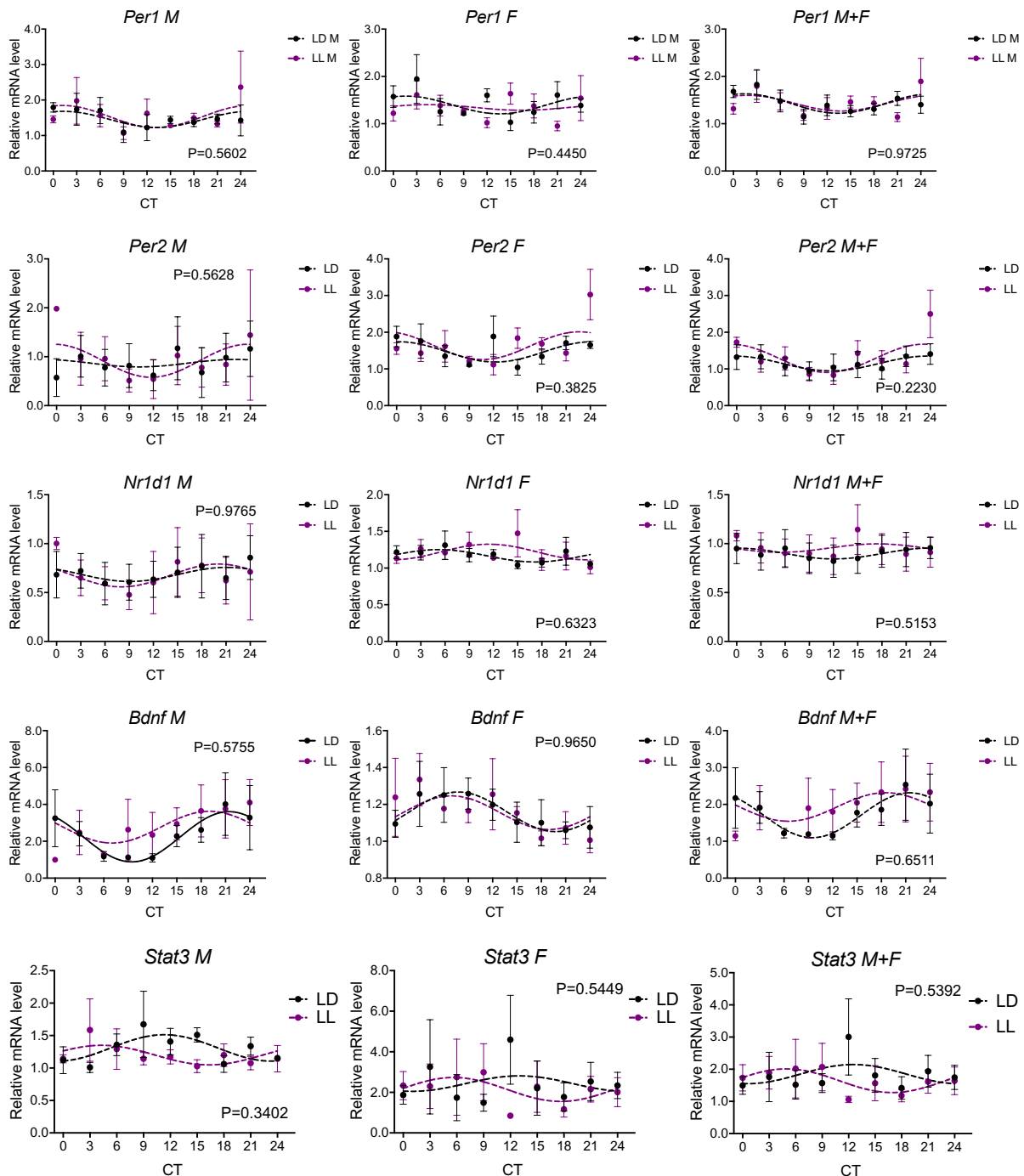
U genů, jejichž rytmická exprese byla potvrzena, jsem pomocí kosinorové analýzy vypočítala hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze rytmu u samců a samic, a dále pro skupinu, ve které byly hodnoty samců a samic spojeny dohromady. Mesor, neboli průměrná hodnota rytmu, a amplituda rytmu jsou uvedeny v hodnotách relativní hladiny mRNA. Akrofáze, neboli doba maximální hodnoty rytmu, je stanovena v hodinách cirkadiálního času CT. Hodnota P je v tabulce vyznačena tučně v případě, že  $P > 0,05$  a rozdíl mezi skupinami je tedy signifikantní (tab. č. 9).

**Tabulka č. 9:** Hodnoty mesoru, amplitudy a akrofáze u rytmů zkoumaných genů v sítnici získané kosinorovou analýzou kontrolní LD skupiny a LL skupiny zvířat samců, samic a samců + samic.

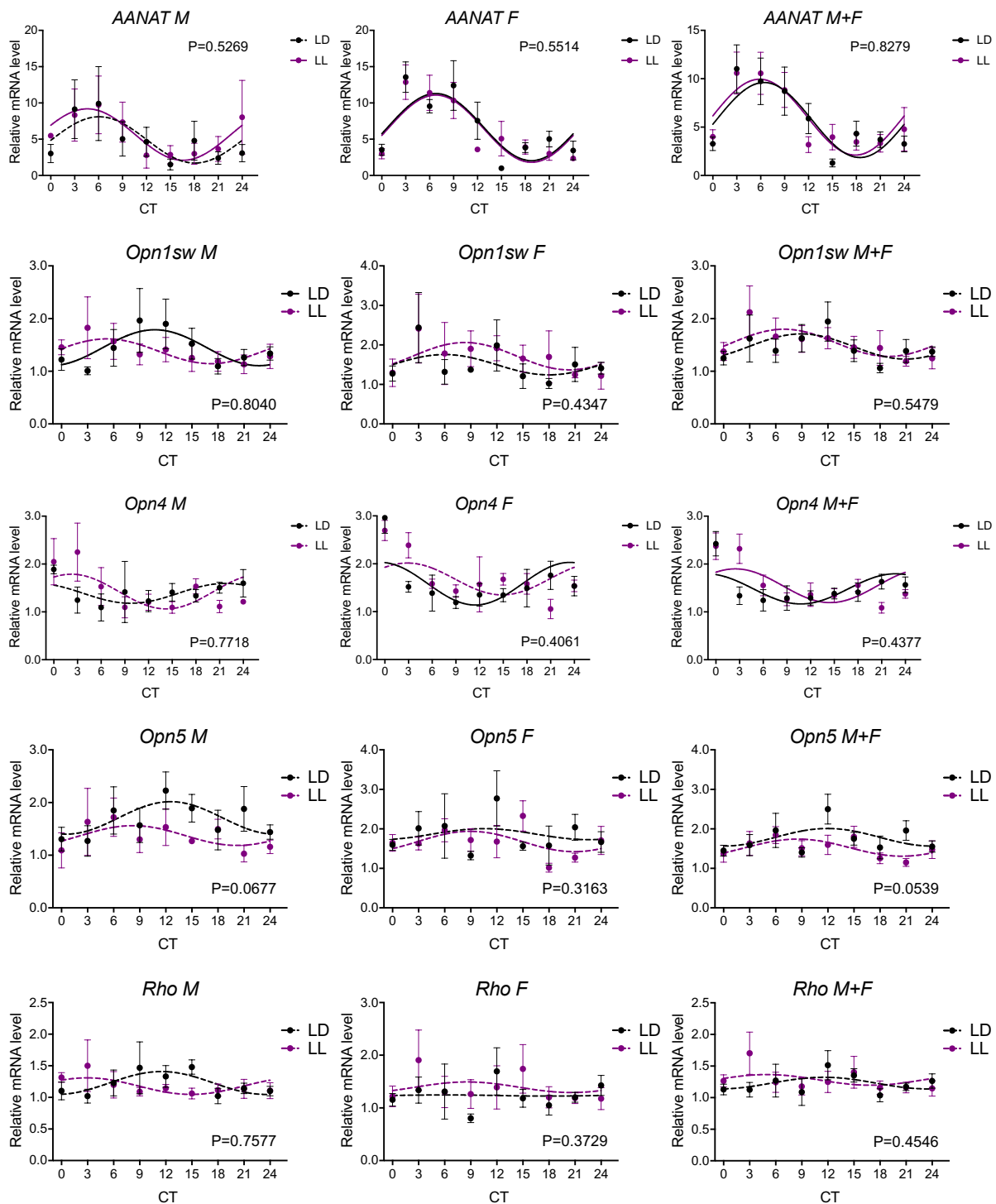
		samci			samice			samci + samice		
		LD	LL	P hod.	LD	LL	P hod.	LD	LL	P hod.
<i>Per1</i>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<i>Per2</i>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<i>Nr1d1</i>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<i>Bdnf</i>	mesor amplituda akrofáze	2,2460 1,3620 21,4500	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<i>Stat3</i>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<i>Aanat</i>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	5,6390 3,5420 4,5910	bez rytmu	6,6700 4,6300 6,7620	6,4510 4,6350 6,7780	0,8196 0,9970 0,9879	5,7340 3,8780 6,4390	6,0280 3,9240 5,8720	0,7099 0,9680 0,5922
<i>Opn1sw</i>	mesor amplituda akrofáze	1,4470 0,3408 10,7300	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<i>Opn4</i>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	1,5840 0,4453 -0,5567	bez rytmu	bez rytmu	1,4810 0,3151 -1,2380	1,5460 0,3526 2,4680	0,5348 0,7958 <b>0,0451</b>
<i>Opn5</i>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu
<i>Rhodopsin</i>	mesor amplituda akrofáze	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu	bez rytmu

Obrázek č. 9 ukazuje expresní profily genů v sítnici s vyznačením prokázané rytmicity a výsledky dvoucestné ANOVA. Test dvoucestná ANOVA vyhodnotil rozdíly měřené v sítnici v expresi všech genů jako nesignifikantní. Konkrétně v expresi genu *Per1* u samců (P=0,5602), u samic (P=0,4450) a u smíšené skupiny (P=0,9725). Stejně tak v expresi genu *Per2* vyhodnotil test výsledky jako nesignifikantní jak u samců (P=0,5628), tak u samic (P=0,3825) a i u smíšené skupiny (P=0,2230). Dále v expresi genu *Nr1d1* u samců (P=0,9765), u samic (P=0,6323) a u smíšené skupiny (P=0,5153). V expresi genu *Bdnf* u samců (P=0,5755), u samic (P=0,9650) a u smíšené skupiny (P=0,6511). V expresu genu *Stat3* u samců (P=0,3402), u samic (P=0,5449) a u smíšené skupiny (P=0,5392). Dále v expresi genu *Aanat* u samců (P=0,5269), u samic (P=0,5514) a u smíšené skupiny (P=0,8279). V expresi opsinu *Opn1sw* rozdíly vyšly také nesignifikantně a to jak u samců (P=0,8040), tak u samic (P=0,4347) a u smíšené skupiny (P=0,5479). Obdobně v expresi genu *Opn4*, kde vyšly nesignifikantní rozdíly opět jak u samců

( $P=0,7718$ ), tak u samic ( $P=0,4061$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,4377$ ). Dále vyšla nesignifikantní exprese genu *Opn5* u samců ( $P=0,0677$ ), u samic ( $P=0,3163$ ) a u smíšené skupiny ( $P=0,0539$ ). Nesignifikantní rozdíly vyšly také v expresi genu *Rho* jak u samců ( $P=0,7577$ ), tak u samic ( $P=0,3729$ ) a i u smíšené skupiny ( $P=0,4546$ ).







**Obrázek č. 9:** Grafy časových profilů exprese vybraných genů v SCN u samců (M), samic (F) a u samců + samic (M+F). Grafy zobrazují kosinorovou křivku pro kontrolní LD skupinu a pro LL skupinu, proloženou průměry relativních hladin mRNA vybraných genů ± SEM v cirkadiálním čase 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 a 24. Hodnoty kontrolní LD skupiny jsou zobrazeny černě, hodnoty LL skupiny fialově. Příslušná sinusoida je v grafu vyznačena přerušovaně, pokud byla statistickými testy zamítnuta rytmicita exprese. Do grafů je dále vložena P hodnota, která byla určena testem dvoucestná ANOVA. Tento test udává míru rozdílu mezi všemi hodnotami obou skupin. Signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) byl vyznačen tučně.

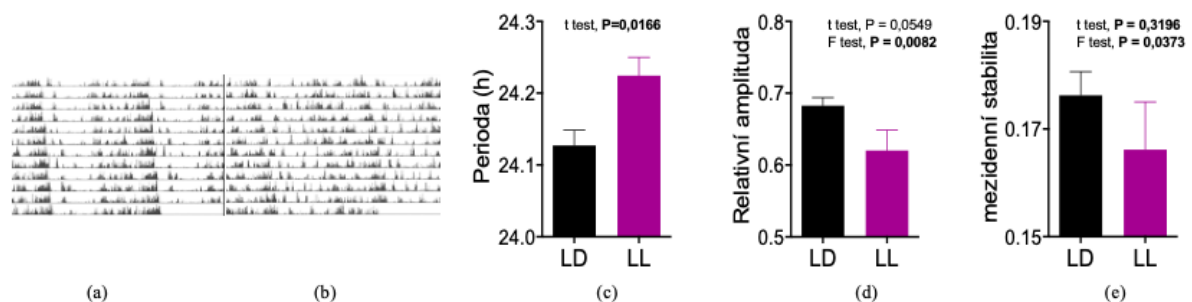
Test trojcestné ANOVA nevyhodnotil žádný výsledek jako signifikantní – *Per1* (P=0,6204), *Per2* (P=0,7084), *Nr1d1* (P=0,9794), *Bdnf* (P=0,8887), *Stat3* (P=0,7445), *Aanat* (P=9363), *Opn1sw* (P=7829), *Opn4* (P=0,8618), *Opn5* (P=0,3313) a *Rho* (P=0,6513).

## 5.2. Výsledky záznamu rytmu lokomoční aktivity

Dlouhodobým záznamem lokomoční aktivity jsme měřili efekt stálého světla působícího během postnatálního období na rytmus v lokomoční aktivitě dospělých samců potkana jako markeru nastavení cirkadiálního systému. Měření lokomoční aktivity bylo prováděno v P60 a ukázalo, že LL skupina měla významně delší endogenní periodu oproti kontrolní LD skupině (obrázek č. 10c). Dále jsme se zaměřili na porovnání relativní amplitudy rytmu mezi oběma skupinami (obrázek č. 10d) a na měření mezidenní stability rytmu obou skupin (obrázek č. 10e). Hodnota relativní amplitudy zobrazuje rozdíly v úrovni aktivity mezi nejvíce a nejméně aktivním obdobím dne, a je zobrazována v rozmezí 0 (nízká variabilita) až 1 (jasné rozlišení).

Mezidenní stabilita vypovídá o schopnosti cirkadiálního systému udržet vnitřní periodu a amplitudu. Nižší hodnota mezidenní stability znamená větší mezidenní odchylku.

Ačkoliv výsledky relativní amplitudy a mezidenní stability neukazují signifikantní rozdíl mezi skupinami, data ukazují signifikantní rozdíl faktoru variance, což naznačuje méně stabilní rytmicitu v LL skupině. Celkové denní aktivity byly podobné mezi skupinami (průměr LD skupiny = 3073,19±123, průměr LL skupiny = 3092,41±145).



**Obrázek č. 10:** Reprezentativní akrogram kontrolní LD skupiny (a) a LL skupiny (b) a efekt vývoje pod stálým světlem (LL, fialová; LD, kontrola, černá) na (c) cirkadiální periodu, (d) relativní amplitudu a (e) mezidenní stabilitu rytmu v lokomoční aktivitě samců potkanů. Zvířata byla chována pod stálým světlem (16 luxů) od P0 do P20, poté byla ponechána v DD podmínkách. Cirkadiální parametry byly měřeny z 12 denního lokomočního nahrávání. Každý sloupec reprezentuje průměr 11 hodnot ± SEM, P = ; dvostranný Studentův t test a F test porovnávající odchylky mezi skupinami.

## 6. Diskuze

V této práci jsem určovala dlouhodobé účinky stálého světla působícího během časného postnatálního období na vývoj cirkadiálních oscilací v SCN, hipokampu, frontálním kortexu a v sítnici. Využila jsem k tomu model expozice stálému světlu mezi P0 a P20. Tento interval byl dříve určen jako kritická perioda vývoje cirkadiálního systému ve vztahu k působení stálého světla. Bylo totiž dokázáno, že právě v tomto intervalu ovlivňuje stálé světlo vývoj rytmu pohybové aktivity (Canal-Corretger *et al.*, 2000; Canal-Corretger *et al.*, 2001). Od P20 do P30 jsme potkany chovali v LD cyklech, abychom odmaskovali přímý účinek stálého světla od vývojových změn.

V porovnání s ostatními studii jsme zvolili nižší intenzitu světla, 15 luxů, která byla přeměřením po skončení experimentu upřesněna na 16 luxů. Tato hladina nepředstavuje riziko poškození sítnice a snižuje možnost vzniku světlem indukované stresové reakce, která by mohla modifikovat výsledek. Hladina 15 luxů byla také zvolena na základě průměrného měření osvětlení chodníku veřejným osvětlením se světelnými zdroji LED.

### 6.1. Vliv stálého světla na cirkadiální rytmy exprese zkoumaných genů

V experimentu jsem testovala citlivost SCN, hipokampu, frontálního kortexu a sítnice k podmínkám stálého světla během raného postnatálního období. V předchozí studii bylo zjištěno, že existují pohlavní rozdíly v efektu stálého světla na vývoji měřené na rytmu lokomoční aktivity v dospělosti (Cambras *et al.*, 1998). Proto jsme v našem experimentu rozhodli skupiny také rozdělit na samce a samice a sledovali jsme případné pohlavní rozdíly ve změně expresních rytmů jako následku vývoje ve stálém světle. Ve třetím typu hodnocení jsme srovnávali rozdíly kontrolní a světelné skupiny bez ohledu na pohlaví.

Rozdíly mezi skupinami jsme posuzovali z hlediska rytmicity, tj. zda byla zachována či zanikla rytmicita exprese prokázaná u kontrolní skupiny, nebo naopak, zda se u zvířat odchovaných na stálém světle prokázala rytmicita, která nebyla naměřená u zvířat kontrolních. Dále jsme sledovali amplitudu, mesor a fázi rytmů a celkový rozdíl mezi skupinami hodnocený testem dvoucestné ANOVA.

#### 6.1.1. Vliv stálého světla na cirkadiální rytmy exprese zkoumaných genů v SCN

Hlavní cirkadiální pacemaker v SCN vykazuje vysokou amplitudu rytmů v expresi hodinových genů (Chun *et al.*, 2015) a také v expresi podjednotek glutamátových receptorů (Bendová *et al.*, 2009; Bendová *et al.*, 2012) i transkripčního faktoru *Stat3* (Moravcová *et al.*,

2016; Moravcová *et al.*, 2018). Naše výsledky jsou s předchozími nálezy v souladu a ukazují u kontrolních zvířat obou pohlaví prokazatelný cirkadiánní rytmus v expresi všech genů, s výjimkou *Bdnf*. Rytmus v expresi *Bdnf* byl sledován naší laboratoří i v roce 2020. Tato studie také neprokázala cirkadiánní rytmus v expresi *Bdnf* (Kubištová *et al.*, 2020).

Potkani odchovaní na stálém světle ztratili rytmicitu v expresi všech genů v SCN s výjimkou *Per2* u obou pohlaví a u *Grin2b* u samic. U genu *Per2* LL potkani sice vykazovali rytmickou expresi, ale rytmus vykazoval významně nižší amplitudu a mesor. Geny *Period* jsou v SCN indukovatelné světlem a podílejí se na nastavování cirkadiánních hodin fází solárního cyklu. Pokud je exprese těchto genů snižena nebo nerytmická, tak tato synchronizace neprobíhá správně. V předchozí studii zabývající se podobným tématem se ukázalo, že po sedmidenní expozici stálému světlu byl snížen počet buněk exprimující PER2 a zároveň byla zpožděna akrofáze rytmu. V této studii byla cirkadiánní exprese *Per2* utlumená, podobně jako v naší studii (Sudo *et al.*, 2003).

Další z hodinových genů, který výrazně změnil expresní profil v SCN u potkanů odchovaných na stálém světle, byl *Nr1d1*, který kóduje jaderný receptor REV-ERB $\alpha$ . REV-ERB $\alpha$  je součástí přídatné smyčky a v cirkadiánním rytmu potlačuje expresi *Bmal1*. Pokud je jeho produkce menší a arytmiická, tak to znamená, že jeho represní funkce je snižena, což vede k nadprodukcí BMAL1 a prodloužení cirkadiánní periody, či k desynchronizaci cirkadiánního molekulárního mechanismu. V předchozí práci naší laboratoře se ukázalo, že rytmus exprese genu *Nr1d1* v SCN se u zvířat odchovaných na stálém světle neliší od kontrol (Kubištová *et al.*, 2020). Tato práce však sledovala expresní změny až u dospělých zvířat v P90, zatímco v této práci jsme pracovali se zvířaty výrazně mladšími, v P30. Je tedy možné, že v dřívější práci se potkani synchronizovali s LD cyklem, do kterého byli stejně jako v této práci umístěni v P20. Rozdíl 40 dnů na LD tedy mohl kompenzovat vývojové změny v rytmické expresi tohoto genu. Další rozdíl mezi oběma pracemi byl v pohlavním zastoupení; v předchozím experimentu se pracovalo pouze se samci, zatímco v tomto pokusu jsme měli potkany rozdělené na samce a samice. Ztráta rytmicity byla potvrzena u obou pohlaví, ale pouze u samic byl rozdíl mezi skupinami potvrzen dvoucestnou ANOVA.

Jak bylo naznačeno na začátku kapitoly, *Bdnf* v naší práci nevykazoval jako jediný hodinový gen cirkadiánní rytmus u kontrolní skupiny. U samců chovaných na LL se však cirkadiánní rytmus objevil, stejně tak ve skupině, kde byli samci a samice dáni dohromady. Pouze u LL samic zůstal rytmus arytmiický. V dřívější práci naší laboratoře u kontrolní skupiny také nebyl objeven rytmus, avšak u skupiny vystavené stálému světlu rytmus nalezen byl (Kubištová *et al.*, 2020). Vzhledem k tomu, že autoři předchozí práce pracovali pouze se samci,

výsledky naznačují, že stálé světlo ve vývoji indukuje cirkadiánní rytmus v expresi genu *Bdnf* v SCN samců. Je nutné podotknout, že v našich výsledcích jsou především u samců patrné velké odchylky mezi hodnotami a tento náález bude nutné znovu ověřit.

*Stat3* je transkripční faktor, který je součástí intracelulární signalizační kaskády aktivované cytokiny, růstovými hormony a řadou dalších látek adaptivní i vrozené imunity (Hirano *et al.*, 2000; Rummel, 2016), a je také považován za onkogen (Bromberg *et al.*, 1999). Působí také jako represor transkripce hodinového genu *Nr1d1* (Wang *et al.*, 2017). Tento transkripční faktor by tak mohl představovat jeden z faktorů, který propojuje imunitní a cirkadiánní systém. Náš experiment ukázal, že u LL potkanů ztrácí jeho exprese v SCN rytmus, prokazatelně u samců a také v hodnocení, které nerozlišuje pohlaví. Význam STAT3 pro funkci SCN ještě není zcela objasněn. Nové výsledky naší laboratoře naznačují, že hraje roli v cirkadiánním mechanismu astrocytů a může mít tedy význam pro interakci mezi gliemi a neurony SCN, či pro zachování homeostatických funkcí SCN.

NMDA receptory jsou hlavní glutamátové receptory, které převádějí synchronizační světelné signály přicházející RHT ze sítnice na neurony VL-SCN. Změna jejich podjednotkového složení způsobuje rozvoj řady neurovývojových či neurodegenerativních onemocnění (Paoletti *et al.*, 2013). Rytmus v expresi konstitutivní podjednotky *Grin1* v SCN byl potvrzen v předchozí práci naší laboratoře (Bendová *et al.*, 2009), podjednotka *Grin2b* je nezbytná pro indukci intracelulárních procesů vedoucích k synchronizaci cirkadiánního mechanismu v SCN a vykazuje rytmus jak ve své expresi, tak v hladině proteinů (Bendová *et al.*, 2012). Naše výsledky ukazují, že exprese *Grin1* u LL potkanů ztrácí rytmicitu v SCN u obou pohlaví, ačkoliv dvoucestná ANOVA rozdíl mezi skupinami nenašla. V již dříve zmíněné práci byla v SCN také prokázána ztráta rytmicity u LL potkanů v expresi *Grin1* i v P90, avšak také bez prokazatelné signifikance získané dvoucestnou ANOVA (Kubištová *et al.*, 2020). U exprese genu *Grin2b* byly patrné rozdíly mezi pohlavími. Zatímco u samců rytmus vymizel, u samic rytmus přetrval i u LL skupiny. I u samic se však lišily významně parametry rytmu mezi skupinami a to v mesoru a akrofázi. Změny rytmicity v expresi podjednotek NMDA receptorů mohou mít za následek změnu dostupnosti těchto receptorů na membráně v dostatečném množství v době, kdy je cirkadiánní systém citlivý na synchronizační působení světla, což může vést k nežádoucím změnám v procesu světelné synchronizace celého cirkadiánního systému.

### 6.1.2. Vliv stálého světla na cirkadiánní rytmy exprese zkoumaných genů v hipokampu

Hipokampus je oblast mozku, která zpracovává informace z mozkové kůry a z limbického systému a směřuje tyto informace dále do mozku. Hraje kritickou roli ve zpracování paměti a to konkrétně v krátkodobém uchovávání informací, dále také hraje roli v prostorové orientaci. Je také zapojen do patofyziologie poruch nálady (Drevets *et al.*, 2008). Ukázalo se, že kognitivní výkon a paměť podléhají cirkadiánní modulaci (Chaudhury and Colwell, 2002). Význam hodinového mechanismu pro funkci hipokampu byl již mnohokrát demonstrován. Příkladem může být studie z roku 2009, která ukázala, že mutanti hodinového genu *Per2* vykazovali změněné hladiny transkripčního faktoru CREB. Úroveň celkového CREB nebyla ovlivněna nedostatkem *Per2*, ovlivněný byl pouze aktivní stav této CREB signální dráhy, který byl měřen fosforylací (Wang *et al.*, 2009). Vzhledem k tomu, že CREB hraje nepostradatelnou roli v procesu dlouhodobé potenciace (LTP, z anglického „*long term potentiation*“) a dlouhodobé paměti (Bozon *et al.*, 2003), výsledky této studie naznačují možnost, že deficity v intracelulárních signálních drahách souvisejících s mutacemi *Per2* mohou být jednou z příčin pozorovaných deficitů v LTP po narušení cirkadiánních hodin hipokampu (Wang *et al.*, 2009). Studie z roku 2008 ukázala, že cirkadiánní systém může narušit schopnost učení se a že učení a paměť jsou citlivé na narušení cirkadiánních rytmů a spánku (Ruby *et al.*, 2008).

U kontrolních skupin jsme pozorovali pohlavní rozdíly v rytmické expresi sledovaných genů. Cirkadiánní rytmus byl potvrzen společně u samců i samic pouze v expresi genu *Per2* a *Grin1*. Prokazatelný rytmus v expresi genů *Nr1d1*, *Bdnf*, *Stat3* a *Grin2a* byl nalezen pouze u samců, nikoliv u samic. Dřívější práce naší laboratoře prokázala cirkadiánní rytmus v expresi genu *Per2*, *Nr1d1*, *Bdnf*, *Stat3*, *Grin1*, *Grin2a* a *Grin2b* v hipokampu 90-denních samců (Kubištová, 2020). Exprese genu *Grin2b* u našich kontrolních zvířat byla arytmiická jak u samců, tak u samic, což se v rozporu s dřívější prací naší laboratoře (Kubištová, 2020). Exprese genu *Per2* byla rytmická pouze u samic, nikoliv u samců. Rozdíly s předchizí studií mohou vyplývat z odlišného věku testovaných zvířat. Je pravděpodobné, že u 90-denních zvířat bude amplituda cirkadiánních rytmů vyšší než u 30-denních zvířat, se kterými jsme pracovali v této studii.

Pohlavní rozdíly v expresi hodinových genů byly popsány pouze v SCN. Aferentní dráhy SCN mohou být ovlivněny pohlavními steroidními hormony, protože exprimují estrogenové a androgenové receptory. Stejně tak eferentní dráhy mohou vykazovat pohlavní rozdíly, protože exprimují jak androgenní, tak estrogenové receptory s různou mírou exprese

(M. Bailey and Silver, 2014). V našem experimentu však pohlavní rozdíly v SCN u kontrolních skupin nalezeny nebyly. Je zajímavé, že ze všech námi zkoumaných struktur jsme našli největší pohlavní rozdíly u kontrolních skupin právě v hipokampu. Jsem si jistá, že toto téma by bylo zajímavé na budoucí výzkum.

Odchov na stálém světle ovlivnil expresi vybraných genů v hipokampu zejména u samců. Z šesti genů rytmujících u kontrolních zvířat byla u LL skupiny prokázána rytmicita pouze v expresi *Nr1d1*, a i tento rytmus má významně nižší hodnotu mesoru proti kontrolám.

Expresie genu *Per1* sice nebyla rytmická ani u jedné ze sledovaných skupin chovaných na LL, dvoucestná ANOVA však potvrdila rozdíl mezi všemi porovnávanými skupinami, tedy u samců, samic i spojené skupiny. Zvířata odchovaná na LL měla totiž výrazně nižší celkovou expresní hladinu *Per1* oproti kontrolám.

Expresie genu *Per2* u potkanů chovaných na LL nebyla rytmická. U samců byl rozdíl mezi kontrolní a LL skupinou dokonce potvrzen signifikantním výsledkem testu dvoucestné ANOVA. To je v rozporu s dřívější prací naší laboratoře, ve které byla nalezena rytmická expresie genu *Per2* u skupiny potkanů chovaných na LL (Kubištová, 2020).

V našem experimentu vyšlo, že expresie genu *Nr1d1* je v hipokampu po vystavení potkanů stálému světle změněna. U samců dokonce vyšel signifikantní rozdíl mezi kontrolní a LL skupinou testem dvoucestná ANOVA. I LL potkani měli rytmus v expresi tohoto genu, změnil se však parametry rytmu. Rozdíl je především v mesoru, kde je hodnota u LL samců výrazně snížena. To je v rozporu se z roku 2013 (Fonken *et al.*, 2013). Tato studie nenašla změnu v expresi genu *Nr1d1* po aplikaci stálého světla. Tato studie však zkoumala efekt stálého světla na dospělých jedincích, oproti naší studii, která byla prováděna na mladých potkanech. V expresi genu *Nr1d1* u samic nám překvapivě vyšla arytmicita u kontrolní skupiny. Tato arytmicita může být vysvětlena velkými odchylkami mezi hodnotami a to zejména na konci cirkadiálního cyklu.

Jsou důkazy o tom, že BDNF je zapojen do LTP v hipokampu (Lu and Gottschalk, 2000). Tetanickou stimulací hipokampu se zvyšuje expresie *Bdnf*, která indukuje LTP. Snížení hladin BDNF zeslabuje LTP, zvýšení hladin BDNF naopak LTP zesiluje (Korte *et al.*, 1995). Pokud dojde k inhibici signalizace BDNF, tak dojde ke zhoršení prostorového učení a také paměti (Mizuno *et al.*, 2000). V naší práci vyšlo, že u samců chovaných pod stálým světlem došlo ke ztrátě rytmu v expresi *Bdnf* oproti kontrolám. U samic nebyl nalezen rytmus ani u kontrol. Signifikantní výsledky však vyšly pouze u samců. Ztráta rytmické exprese genu *Bdnf* a jeho menší exprese v hipokampu může tedy vést k zeslabení LTP, což se negativně projeví na paměti a na prostorovém učení.

Expresí genu *Stat3* byla arytmičká u všech skupin (samci, samice, samci + samice) chovaných na stálém světle. U samců vyšel signifikantní rozdíl mezi LL a kontrolní skupinou v testu dvoucestná ANOVA. V dřívější práci naší laboratoře však byla nalezena rytmicita u potkanů chovaných na LL (Kubištová, 2020). U genu *Stat3* tedy dochází ke stejné situaci jako u exprese genu *Per2*. Otázkou zůstává, zda tyto rozdíly způsobil fakt, že v dřívější práci byl pokus prováděn až na starších potkanech, nebo rozdíly způsobilo to, že v každé práci byla použita jiná intenzita světla. Doposud neexistují žádné další studie, které by se zabývaly vlivem stálého světla na rytmickou expresi genu *Stat3* a tak není možné vyvodit jednoznačný závěr.

U podjednotek NMDA receptorů *Grin1* a *Grin2a* byla prokázána ztráta rytmicity u LL skupiny a to u samců i u samic. U samců byly dokonce rozdíly mezi kontrolní a LL skupinou potvrzeny signifikantním výsledkem dvoucestné ANOVA. Podobně jako u exprese genu *Per2* a *Stat3*, ani toto neodpovídá výsledkům naší laboratoře, která u skupiny potkanů vystavených stálému světle prokázala rytmickou expresi genu *Grin2a* (Kubištová, 2020). U genu *Grin2b* nebyl stejně jako u kontrolní skupiny prokázán rytmus ani u samců, ani u samic. Rozdíl mezi kontrolní a LL skupinou u samců byl však signifikantně potvrzen dvoucestnou ANOVA. Výsledky z naší práce naznačují, že stálé světlo má vliv na potlačení rytmické exprese podjednotek NMDA receptoru v hipokampu, a že může docházet ke změně zastoupení GluN2 podjednotek NMDA receptoru, což může způsobit změny ve funkci receptoru a afinitu k ligandu. Doposud nebyly publikovány žádné obdobné práce, které by zkoumaly vliv stálého světla na podjednotky NMDA receptoru, a tak není možné učinit srovnání s výsledky jiných laboratoří.

### 6.1.3. Vliv stálého světla na cirkadiánní rytmy exprese zkoumaných genů ve frontálním kortexu

Studie z roku 2013 dokázala, že hodinové geny *Per1*, *Per2* a *Nr1d1* jsou rytmicky exprimované v neokortexu potkana (Rath *et al.*, 2013). V naší práci jsme se zaměřili na expresi těchto genů ve frontálním kortexu, a v souladu s citovanou prací, byla jejich exprese u kontrolní skupiny rytmická. Naše výsledky ale také naznačily rytmus v expresi podjednotek NMDA receptoru, rytmus v expresi *Grin2a* byl významný u samců a *Grin2b* u samic. U kontrolních samců byl také rytmicky exprimován gen *Bdnf*. Funkce *Bdnf* v procesech učení a paměti nebyla prokázána jen v hipokampu, ale také ve frontální kůře. Nižší hladiny *Bdnf* ve frontálním kortexu mohou korelovat s poškozením pracovní paměti, to bylo ukázáno ve studii, kde objevily negativní korelace mezi hladinami proteinu BDNF ve frontální kůře a počtem chyb pracovní



paměti (Bimonte-Nelson *et al.*, 2003). Jeho rytmická exprese tedy může podporovat cirkadiánní rytmus v ukládání paměťových stop měřených na behaviorální úrovni.

Vývoj potkanů na stálém světle způsobil ztrátu rytmicity pouze v expresi genu *Per1* a *Grin2a* u samců. V kontextu působení stálého světla ve vývoji na expresní profily většiny genů ve všech sledovaných strukturách je překvapivé, že ve frontální kůře odchov na LL některé rytmy naopak indukoval. U samic byl zjištěn významný rytmus v expresi *Stat3*, *Grin1* a *Grin2a*, a u samců rytmus v expresi *Grin2b*. Srovnání skupin dvoucestnou ANOVA však bohužel neprokázalo žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami u žádného ze studovaných genů. Frontální kůra tak, i přes rozdíly v rytmicitě vyplývající z kosironové analýzy, nejméně reaguje na světelné podmínky v časném postnatálním vývoji ze všech studovaných struktur mozku.

#### 6.1.4. Vliv stálého světla na cirkadiánní rytmy exprese zkoumaných genů v sítnici

Sítnice patří stejně jako SCN a čichový lalok mezi sebeudržující oscilátory. Cirkadiánní systém sítnice je důležitý jednak pro regulaci fyziologických procesů v sítnici samotné, ale je důležitý i pro kvalitní obrazové a neobrazové vidění.

U kontrolních skupin byla nalezena rytmická exprese hodinových genů pouze u genu *Bdnf* a to jen u samců a pak také u genu *Aanat*, opět pouze u samců. To je v rozporu s dalšími studiemi. Například ve studii z roku 2005 byla potvrzena rytmická exprese genu *Per2*. *Per2* vykazoval vyšší hladiny kolem CT14-17 a nižší hladiny kolem CT23-5 (Kamphuis *et al.*, 2005). V naší studii jsou pozorovatelné pouze velmi slabé variace a nižší hladiny lze pozorovat kolem CT12. V té samé studii dále výsledky odhalily pouze velmi slabý trend cirkadiánních změn u genu *Per1*. Tato studie však stejně jako naše studie nepotvrdila rytmickou expresi genu *Per1*. V dřívější práci naší laboratoře byla ale rytmická exprese genu *Per1* potvrzena (Kubištová *et al.*, 2020). I studie z roku 2001 však ukázala vrchol *Per2* v CT14 a úroveň *Per1* konstantní (Namihira *et al.*, 2001). Tato studie však podotýká, že fakt, že u *Per1* nebyl nalezen rytmus, nemusí znamenat, že tam ten rytmus opravdu není. Cirkadiánní rytmus s malou amplitudou ve vnitřní jaderné vrstvě sítnice může být maskován nerytmickou expresí ve vnější jaderné vrstvě sítnice, či rytmickou expresí v jednotlivých vrstvách která však porbívá s jinou fází. Ve vzorku celé sítnice se všemi vrstvami, tak jak byla použita v naší práci, tak mohou být rytmy jednotlivých vrstev zamaskovány.

BDNF je důležitý faktor ve vývoji sítnice. Reguluje vývoj podtypů amakrinních buněk a reguluje morfologické zrání gangliových buněk (Cellerino *et al.*, 2003; Cohen-Cory and Lom, 2004). Bohužel neexistují studie, které by se zabývaly cirkadiánní expresí genu *Bdnf* v sítnici. V naší práci byla nalezena rytmická exprese genu *Bdnf* u samců.

Studie ukázaly, že ztráta *Nr1dl* v sítnici může vést ke změně signální dráhy uvnitř fotoreceptorových buněk a tato ztráta také může snižovat funkci sítnice (Mollema *et al.*, 2011). Cirkadiánní exprese tohoto genu nebyla v naší studii u kontrolní skupiny nalezena ani u kontrolní, ani u LL skupiny. Dřívější studie potvrdila naše výsledky tím, že nenašla cirkadiánní rozdíly v expresi genu *Rev-erb* u potkanů chovaných na LD a na LL (Kamphuis *et al.*, 2005). Stejně tak nebyla potvrzena cirkadiánní exprese genu *Stat3*.

AANAT je zodpovědný za syntézu melatoninu v epifýze, ale i v sítnici (Binkley *et al.*, 1979). Gen pro *Aanat* patří mezi hodinami kontrolované geny a má tedy ve svém promotoru E-box. V případě dlouhodobé změny exprese hodinových genů by dopady mohly vést až ke změně syntézy melatoninu na sítnici. U kontrolní skupiny jsme našli rytmus v expresi tohoto genu pouze u samic a u skupiny kombinované z obou pohlaví.

V naší práci jsme ukázali, že expozice stálému světlu nemá na expresi rytmu *Per1* v sítnici žádný významný vliv. Exprese *Per1* u samčí i samičí skupiny odchované na stálém světle byla arytmičká, stejně jako u kontrolní skupiny. To je opět v rozporu s dřívější prací aší laboratoře, která prokázala rytmickou expresi genu *Per1* i u skupiny chované na stálém světle (Kubištová *et al.*, 2020). U genu *Per2* naše práce také neprokázala rytmickou expresi u skupin chovaných pod stálým světlem, je však nutné podotknout, že u této skupiny se nachází velké odchylky mezi naměřenými hodnotami a tak mohou být výsledky zkresleny nepřesným měřením. Také u genu *Nr1dl* u skupin odchovaných pod stálým světlem nebyla stejně jako u kontrolních skupin nalezena rytmická exprese tohoto genu. V práci z roku 2008 bylo dokázáno, že potkani vystaveni stálému světlu během prvních tří týdnů života měli zvýšenou hladinu BDNF v gangliových a amakrinních buňkách sítnice (Fujieda and Sasaki, 2008). To, že se obsah *Bdnf* v sítnici zvyšuje po expozici stálému světlu, bylo ukázáno i ve studii (Pollock *et al.*, 2001). V naší práci bylo ukázáno, že u samců došlo po expozici stálému světlu ke ztrátě rytmické exprese genu *Bdnf*, u samic byla tato exprese také arytmičká, stejně jako u kontrolní skupiny. Ani u jedné skupiny však nebyly rozdíly mezi skupinami signifikantní. Exprese genu *Stat3* po expozici stálému světlu zůstala také arytmičká. V naší práci dále vyšlo, že u samců dochází ke změně v rytmické expresi genu *Aanat*, což je zodpovědný za produkci melatoninu. Vyšlo nám, že u kontrolní skupiny samců rytmus v expresi tohoto genu není, zatímco u samců, chovaných pod stálým světlem rytmus je. Což by znamenalo, že stálé světlo indukuje cirkadiánní rytmus genu *Aanat* u samců. Tento výsledný ale spíše vyplývá z velkých odchylek mezi hodnotami u kontrolní skupiny a může být dán metodickou chybou. U samic a i u skupiny kombinované z obou pohlaví vyšla cirkadiánní exprese genu *Aanat* rytmická jak u kontrolní skupiny, tak u LL skupiny.

V naší práci jsme dále zkoumali cirkadiánní expresi tkáňově specifických genů pro sítnici – opsinů *Opn1sw*, *Opn4*, *Opn5* a *Rho*. Rytmicitou expresi u kontrolních skupin jsme prokázali u genu *Opn1sw* u samců a u genu *Opn4* u samic. Dřívější práce naší laboratoře prokázala navíc rytmicitou expresi genu *Rho* v sítnici 90-denníchamečů, tento rytmus jsme však u 30-denních zvířat nepotvrdili (Kubištová *et al.*, 2020).

V expresi genu *Opn1sw*, což je krátkovlnný opsin, který se nachází v čípcích sítnice, jsme v naší studii prokázali ztrátu rytmicity u samců chovaných na stálém světle. U samic chovaných na stálém světle zůstala exprese arytmiická, stejně jako u kontrol.

V dřívější práci naší laboratoře bylo prokázáno signifikantní snížení exprese *Opn4* u skupiny chované na stálém světle. Exprese toho genu byla sice snižená, ale i tak byla rytmická (Kubištová *et al.*, 2020). V naší práci se však nepodařilo prokázat rytmicitu ani u samců ani u samic vystavených stálému světle. Trvalé snížení exprese melanopsinu by mohlo vést ke snížené citlivosti dráhy pro neobrazové vidění pro světlo. To by vedlo ke zmenšení fázového posunu cirkadiánních rytmů po vystavení světelnému pulzu.

*Opn5* je UVA-fotosenzitivní pigment gangliových buněk sítnice savců (Kojima *et al.*, 2011). Jeho exprese u skupin potkanů chovaných pod stálým světlem je stejně jako u kontrol arytmiická. U skupin samců je však výsledek dvoucestné ANOVA relativně blízko signifikantnímu rozdílu. U samců chovaných pod stálým světlem tedy dochází ke snížení exprese tohoto genu. *Opn5* může selektivně aktivovat Gi-signalizaci v závislosti na světle, čímž snižuje hladinu cAMP, pravděpodobně prostřednictvím inhibice aktivity adenylátcyklázy (Kojima *et al.*, 2011). Snížením exprese *Opn5* po expozici stálému světle můžeme dojít ke ztrátě této funkce.

Jelikož dřívější studie zaznamenaly u zvířat, která měla potlačenou expresi rodopsinu v tyčinkách, zvýšený práh citlivosti na světlo a také sníženou celkovou odpověď na přítomnost světla na úrovni jednotlivých buněk, rozhodli jsme se detekovat také expresní hladinu *Rho*. Je možné, že také u našich zvířat došlo k podobné snížení citlivosti na světlo, významnější pokles exprese *Rho* jsme však u zvířat odchovaných na LL nezaznamenali.

Různé výsledky mohou souviset s tím, že sítnice je komplexní sítí různých cirkadiánních hodin v různých vrstvách sítnice. My jsme brali sítnici jako jednu tkáň, což může vést k zavádějícím výsledkům, jak bylo naznačeno výše. Výzkum v této oblasti by se dle mého měl dále soustředit především na jednotlivé části sítnice, aby došlo k plnému pochopení funkce cirkadiánních hodin v sítnici.

Trojcestná ANOVA popisuje, zda na hodnotu veličiny pro určitého jedince má statisticky významný vliv hodnota některého znaku. V našem případě se porovnává vliv pohlaví, vliv skupiny a vliv času. Tedy jestli se hodnoty pro jednotlivé skupiny (LD samci, LD samice, LL samci a LL samice) signifikantně liší. Bohužel nám trojcestná ANOVA nevyhodnotila žádný výsledek jako signifikantní. V jednotlivých rytmech však pohlavní rozdíly pozorovat lze. Toto lze vysvětlit velkými rozptyly mezi naměřenými hodnotami. V naší studii jsme na každý časový bod použili pouze čtyři samce a čtyři samice. V dalších studiích by možná bylo vhodné použít víc zástupců jednotlivých kategorií, aby nevznikaly tak velké odchylky naměřených hodnot.

Co se týče exprese genů, tak v SCN reagoval na změnu světelných podmínek nejméně gen *Grin1* ( $P=0,8648$ ) a to u samců. Naopak nejvíce reagoval gen *Per2* ( $P=0,0017$ ) a to u smíšené skupiny. V hipokampu reagoval nejméně gen *Nr1d1* ( $P=0,7845$ ) u samic a nejvíce gen *Per1* ( $P=0,0001$ ) u smíšené skupiny. Ve frontálním kortexu reagoval nejméně gen *Stat3* ( $P=0,8793$ ) u samců a nejvíce gen *Nr1d1* ( $P=0,0996$ ) opět u samců. V retině reagoval nejméně gen *Nr1d1* ( $P=0,9765$ ) u samců a nejvíce naopak gen *Opn5* ( $P=0,0539$ ) u smíšené skupiny.

Naše práce odhalila dlouhodobé změny rytmů v expresi genů, které byly způsobeny stálým světlem aplikovaném v časném postnatálním vývoji. Arytmicita vznikající vývojem na stálém světle může být způsobena desynchronizací buněčných oscilátorů v SCN, což vede k selhání SCN v generování jednotné stabilní periody (Ohta *et al.*, 2005). Právě tráta mezibuněčné synchronizace v SCN je důvod snížené amplitudy cirkadiálních oscilací v perifériích. Periferní oscilátory pak postrádají vazebné mechanismy, které udržují časovou organizaci na úrovni tkání (Ohta *et al.*, 2005). Frontální kortex reaguje ze všech studovaných struktur mozku nejméně na změněné světelné podmínky v raném postnatálním vývoji. Naopak hipokampus reaguje ze všech zkoumaných struktur nejvíce na světelné podmínky v časném postnatálním vývoji. To znamená, že narušení SCN stálým světlem naruší nejvíce synchronizaci hipokampu. Narušení funkce hipokampu může mít dalekosáhlé důsledky. Hipokampus totiž hraje kritickou roli ve zpracování paměti a to konkrétně v krátkodobém uchování informací, dále také hraje roli v prostorové orientaci. Dále bylo dokázáno, že hipokampus je zapojen i do patofyziologie poruch nálady (Drevets *et al.*, 2008). Ukázalo se, že kognitivní výkon a paměť podléhají cirkadiální modulaci (Chaudhury and Colwell, 2002). To dokázala i studie z roku 2008, které tvrdí, že chronické narušení cirkadiálních rytmů zhoršuje hipokampální paměť u potkanů (Craig and McDonald, 2008).

## 6.2. Vliv stálého světla na lokomoční aktivitu dospělých potkanů

V tomto experimentu jsme testovali vliv odchovu na stálém světle na vývoj cirkadiálního systému pomocí behaviorálního markeru, rytmu v lokomoční aktivitě. Potkani byli od P20 chováni v klasických LD podmínkách pod dobu deseti dní a následně byli umístěni do podmínek stálé tmy. V podmínkách stálé tmy byli chováni po dobu 14 dní, během kterých byla měřena jejich lokomoční aktivita. Výsledky ukázaly, že LL skupina vykazovala delší endogenní periodu s porovnáním s LD kontrolní skupinou. Je známo již z dřívějších studií, že když se zvířata rodí za podmínek stálého světla a následně v těchto podmínkách zůstávají, tak u nich dochází ke snížení amplitudy rytmu pohybové aktivity. Tyto výsledky naznačují, že stálé světlo inhibuje proces synchronizace mezi oscilátory, které řídí rytmus lokomoční aktivity (Cambras and Díez-Noguera, 1990).

Ve studii (Cambras *et al.*, 1998) bylo ukázáno, že existují pohlavní rozdíly v rytmu lokomoční aktivity u potkanů, kteří byli chováni na stálém světle během laktace. V našem experimentu jsme však měřili pohybovou aktivitu pouze u samců, neboť pohybový záznam samic může být zkreslen zvýšenou aktivitou během estru. Tuto zvýšenou aktivitu nedokáže analytický program odfiltrovat.

Ačkoliv hodnoty relativní amplitudy a parametru vyjadřujícího stabilitu rytmu mezi jednotlivými cykly nejsou mezi skupinami statisticky odlišné, významně odlišný je statistický faktor F, což je faktor vyjadřující variabilitu hodnot v rámci jedné skupiny. Tento faktor ukazuje, že hodnoty u LL skupiny se liší výrazněji jedna od druhé než v kontrolní skupině, což může indikovat slabší synchronizační aktivitu cirkadiálních hodin u zvířat odchovaných na LL.

Z našich pozorování můžeme vyvodit závěr, že pokud jsou potkani vystaveni stálému světle, tak to vyvolá trvalé změny v synchronizaci cirkadiálních hodin. Pozorovali jsme totiž, že cirkadiální rytmus potkanů zůstává narušen i po několika týdnech v LD prostředí. Trvalé změny podporují i výsledky zjištěné v měření cirkadiální exprese hodinových genů v SCN.

## 7. Závěr

Před zavedením umělého osvětlení před více než 100 lety byli lidé vystavováni minimu světla v průběhu noci. Úplněk osvětluje za jasné noci prostředí světlem 0,1 – 1 lux. Svíčka vyzařuje světlo o 1 luxu. Elektrické osvětlení vedlo k umělému prodloužení dne, umožnilo práci na směny a postupem času i další vynálezy přispěly k narušení tmy v noci, jako jsou například televize či obrazovky počítačů a mobilních telefonů. Dnes se intenzita světla na běžné městské ulici odhaduje na 5-15 luxů a typický obývací pokoj bývá osvětlen 100-300 luxy (Gaston *et al.*, 2013).

Vliv stálého světla na organismus dospělého člověka i laboratorních zvířat je dnes už intenzivně studován. Méně je však studován vliv stálého světla na vývoj organismu, což je společensky neméně důležité téma. Má práce poskytuje srovnání expresních profilů hodinových genů *Per1*, *Per2*, *Nr1d1*, dále *Bdnf*, *Stat3*, *Aanat*, *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b* a dalších tkáňově specifických genů *Rho*, *Opn1sw*, *Opn4*, *Opn5* mezi skupinami potkanů odchovaných na stálém světle a kontrolních zvířat, která vyrostla v prostředí absolutní tmy v noci. Provedli jsme celkem 21 párových srovnání v SCN a v hipokampu mezi kontrolní a pokusnou skupinou. Dvoucestná ANOVA potvrdila jedenáct signifikantně rozdílných expresních profilů v SCN a čtrnáct v hipokampu. Z 24 srovnání ve frontální kůře a ze 30 srovnání v sítnici oka nebyl testem dvoucestná ANOVA prokázán žádný rozdíl mezi skupinami. Ze srovnání s předchozími výsledky a studiemi i z grafického vyjádření našich výsledků vyplývá, že frontální kortex opravu nejméně reaguje na změnu světelných podmínek v časném vývoji. Výsledky srovnání expresních profilů v sítnici oka však naznačují rozdíly mezi skupinami, které však nejsou statisticky potvrzeny, nejspíše díky velkým odchylkám mezi jednotlivými hodnotami. Domníváme se, že pro analýzu rytmů v genové expresi oka je nezbytné rozlišovat mezi jednotlivými vrstvami sítnice, které mohou rytmovat s jinou fází. Tento poznatek zohledníme v některé z dalších prací.

V práci jsme také zjišťovali, zda má vývoj na stálém světle rozdílné účinky na expresi hodinových a dalších genů u obou pohlaví. Analýza rytmu kosinorovou analýzou naznačila pohlavní rozdíly zejména v hipokampu v expresi genů *Per1*, *Nr1d1*, *Bdnf* a *Stat3* a ve frontálním kortexu v expresi genů *Per1*, *Bdnf*, *Stat*, *Grin1*, *Grin2a* a *Grin2b*. Rozdíly v expresních profilech v hipokampu mezi skupinami hodnocené dvoucestnou ANOVA poukázaly na větší citlivost samců – všechny expresní profily byly signifikantně odlišné u samců, zatímco pouze jeden u samic. Trojcestná ANOVA však pohlaní rozdíly v reaktivitě žádného z genů a žádné ze struktur mozku nepotvrdila.

Práce také pojednává o vlivu vývoje na stálém světle na rytmus v lokomoční aktivitě v pozdější fázi života potkana. V pokusu, který monitoroval lokomoční aktivitu potkanů, bylo ukázáno, že LL skupina potkanů měla delší endogenní periodu oproti kontrolní skupině.

Naše výsledky naznačují, že časný postnatální vývoj na stálém světle může indukovat přetrvávající změny v genové expresi zejména v SCN a v hipokampu a může tak způsobit dlouhotrvající reorganizaci cirkadiálních hodin. Naše výsledky potvrzují, že je nezbytné věnovat pozornost nepříznivým důsledkům, jaké mohou nastat např. při vystavování narozených dětí intenzivnímu světlu v porodnicích, či usínání malých dětí se zapnutým světlem.

## 8. Seznam literatury

- Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, *916*, 172–191.
- Agbaria, S., Haim, A., Fares, F., & Zubidat, A. E. (2019). Epigenetic modification in 4T1 mouse breast cancer model by artificial light at night and melatonin – the role of DNA-methyltransferase. *Chronobiology International*, *36*(5), 629–643.
- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Shibata, S. (1999). Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *The Journal of Neuroscience*, *19*(3), 1115–1121.
- Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z. S., & Lee, C. C. (2001). mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *Journal of Biological Rhythms*, *16*(2), 100–104.
- Albus, H., Vansteensel, M. J., Michel, S., Block, G. D., & Meijer, J. H. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Current Biology*, *15*, 886–893.
- Anson, L. C., Chen, P. E., Wyllie, D. J. A., Colquhoun, D., & Schoepfer, R. (1998). Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *Journal of Neuroscience*, *18*(2), 581–589.
- Asano, Y. (1971). The maturation of the circadian rhythm of brain norepinephrine and serotonin in the rat. *Life Sciences*, *10*, 883–894.
- Aton, S. J., Colwell, C. S., Harmar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, *8*(4), 476–483.
- Báez-Ruiz, A., Guerrero-Vargas, N. N., Cázarez-Márquez, F., Sabath, E., del Carmen Basualdo, M., Salgado-Delgado, R., Escobar, C., & Buijs, R. M. (2017). Food in synchrony with melatonin and corticosterone relieves constant light disturbed metabolism. *Journal of Endocrinology*, *235*(3), 167–178.
- Bailey, M. J., Chong, N. W., Xiong, J., & Cassone, V. M. (2002). Chickens' Cry2: Molecular analysis of an avian cryptochrome in retinal and pineal photoreceptors. *FEBS Letters*, *513*(2–3), 169–174.
- \*Bailey, M., & Silver, R. (2014). Sex differences in circadian timing systems: Implications



- for disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35, 111–139.
- Bendová, Z., Sumová, A., & Mikkelsen, J. D. (2009). Circadian and developmental regulation of N-methyl-D-aspartate-receptor 1 mRNA splice variants and N-methyl-D-aspartate-receptor 3 subunit expression within the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 159(2), 599–609.
- Bendová, Z., Sládek, M., & Svobodová, I. (2012). The expression of NR2B subunit of NMDA receptor in the suprachiasmatic nucleus of Wistar rats and its role in glutamate-induced CREB and ERK1/2 phosphorylation. *Neurochemistry International*, 61(1), 43–47.
- Bendová, Z., Sumová, A., & Illnerová, H. (2004). Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research*, 148(1), 105–112.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295, 1070–1073.
- Bimonte-Nelson, H. A., Hunter, C. L., Nelson, M. E., & Granholm, A.-C. E. (2003). Frontal cortex BDNF levels correlate with working memory in an animal model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, 139, 47–57.
- Binkley, S., Hryshchyshyn, M., & Reilly, K. (1979). N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland. In *Nature* (Vol. 281, pp. 479–481).
- \*Bozon, B., Kelly, Á., Josselyn, S. A., Silva, A. J., Davis, S., & Laroche, S. (2003). MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 358, 805–814.
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., & Darnell, J. E. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98, 295–303.
- \*Brooks, E., & Canal, M. M. (2013). Development of circadian rhythms: Role of postnatal light environment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(4), 551–560.
- Brooks, E., Patel, D., & Mercè Canal, M. (2014). Programming of mice circadian photic responses by postnatal light environment. *PLoS ONE*, 9(5), 1–12.
- Brown, T. M., Colwell, C. S., Waschek, J. A., & Piggins, H. D. (2006). Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice. *Journal of Neurophysiology*, 97(3), 2553–2558.
- Bumgarner, J. R., Walker, W. H., Liu, J. A., Walton, J. C., & Nelson, R. J. (2020). Dim light at night exposure induces cold hyperalgesia and mechanical allodynia in male mice.

- Neuroscience*, 434, 111–119.
- Cambras, T., Canal, M. M., Torres, A., Vilaplana, J., & Díez-Noguera, A. (1997). Manifestation of circadian rhythm under constant light depends on lighting conditions during lactation. *American Journal of Physiology*, 272, 1039–1046.
- Cambras, T., & Díez-Noguera, A. (1990). Evolution of rat motor activity circadian rhythm under three different light patterns. *Physiology & Behavior*, 49, 63–68.
- Cambras, T., Vilaplana, J., Torres, A., Canal, M. M., Casamitjana, N., Campuzano, A., & Díez-Noguera, A. (1998). Constant bright light (LL) during lactation in rats prevents arrhythmicity due to LL. *Physiology and Behavior*, 63(5), 875–882.
- Canal-Corretger, M. M., Cambras, T., Vilaplana, J., & Díez-Noguera, A. (2000). Bright light during lactation alters the functioning of the circadian system of adult rats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 278, 201–208.
- Canal-Corretger, M. M., Vilaplana, J., Cambras, T., & Díez-Noguera, A. (2001). Functioning of the rat circadian system is modified by light applied in critical postnatal days. *American Journal of Physiology*, 280, 1023–1030.
- Canal, M. M., Mohammed, N. M., & Rodríguez, J. J. (2009). Early programming of astrocyte organization in the mouse suprachiasmatic nuclei by light. *Chronobiology International*, 26(8), 1545–1558.
- Cellerino, A., Arango-González, B., Pinzón-Duarte, G., & Kohler, K. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates expression of vasoactive intestinal polypeptide in retinal amacrine cells. *Journal of Comparative Neurology*, 467, 97–104.
- Chang, A. M., Aeschbach, D., Duffy, J. F., & Czeisler, C. A. (2015). Evening use of light-emitting eReaders negatively affects sleep, circadian timing, and next-morning alertness. *PNAS*, 112(4), 1232–1237.
- Chaudhury, D., & Colwell, C. S. (2002). Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behavioural Brain Research*, 133, 95–108.
- Chazot, P. L., & Stephenson, F. A. (1997). Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: Direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *Journal of Neurochemistry*, 69(5), 2138–2144.
- Chun, L. E., Woodruff, E. R., Morton, S., Hinds, L. R., & Spencer, R. L. (2015). Variations in phase and amplitude of rhythmic clock gene expression across prefrontal cortex, hippocampus, amygdala, and hypothalamic paraventricular and suprachiasmatic nuclei

- of male and female rats. *Journal of Biological Rhythms*, 30(5), 417–436.
- Cinzano, P., Falchi, F., & Elvidge, C. D. (2001). The first World Atlas of the artificial night sky brightness. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 328(3), 689–707.
- Cinzano, P., Falchi, F., Elvidge, C. D., & Baugh, K. E. (2000). The artificial night sky brightness mapped from DMSP satellite Operational Linescan System measurements. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 318(3), 641–657.
- Cissé, Y. M., Peng, J., & Nelson, R. J. (2016). Dim light at night prior to adolescence increases adult anxiety-like behaviors. *Chronobiology International*, 33(10), 1473–1480.
- \*Cohen-Cory, S., & Lom, B. (2004). Neurotrophic regulation of retinal ganglion cell synaptic connectivity: from axons and dendrites to synapses. *International Journal of Developmental Biology*, 48, 947–956.
- Colwell, C. S. (2000). Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurobiology*, 43(4), 379–388.
- Coomans, C. P., Van Den Berg, S. A. A., Houben, T., Van Klinken, J. B., Van Den Berg, R., Pronk, A. C. M., Havekes, L. M., Romijn, J. A., Van Dijk, K. W., Biermasz, N. R., & Meijer, J. H. (2013). Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *FASEB Journal*, 27(4), 1721–1732.
- Cos, S., Mediavilla, D., Martínez-Campa, C., González, A., Alonso-González, C., & Sánchez-Barceló, E. J. (2006). Exposure to light-at-night increases the growth of DMBA-induced mammary adenocarcinomas in rats. *Cancer Letters*, 235, 266–271.
- Craig, L. A., & McDonald, R. J. (2008). Chronic disruption of circadian rhythms impairs hippocampal memory in the rat. *Brain Research Bulletin*, 76, 141–151.
- Curtis, D. R., & Watkins, J. C. (1963). Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *The Journal of Physiology*, 166, 1–14.
- Damiola, F., Le Minli, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes and Development*, 14(23), 2950–2961.
- Davis, F. C., & Gorski, R. A. (1988). Development of hamster circadian rhythms: Role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Physiology A*, 162(5), 601–610.
- Ding, J. M., Faiman, L. E., Hurst, W. J., Kuriashkina, L. R., & Gillette, M. U. (1997). Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *The Journal of Neuroscience*, 17(2), 667–675.

- \*Drevets, W. C., Price, J. L., & Furey, M. L. (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*, 213, 93–118.
- Falchi, F., Furgoni, R., Gallaway, T. A., Rybnikova, N. A., Portnov, B. A., Baugh, K., Cinzano, P., & Elvidge, C. D. (2019). Light pollution in USA and Europe: The good, the bad and the ugly. *Journal of Environmental Management*, 248, 1–16.
- Falchi, Fabio, Cinzano, P., Duriscoe, D., Kyba, C. C. M., Elvidge, C. D., Baugh, K., Portnov, B. A., Rybnikova, N. A., & Furgoni, R. (2016). The new world atlas of artificial night sky brightness. *Science Advances*, 2(6), 1–25.
- Farajnia, S., Van Westering, T. L. E., Meijer, J. H., & Michel, S. (2014). Seasonal induction of GABAergic excitation in the central mammalian clock. *PNAS*, 111(26), 9627–9632.
- Fei, Y. (2003). Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice. *Molecular Vision*, 9, 31–42.
- Fonken, L. K., Aubrecht, T. G., Meléndez-Fernández, O. H., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2013). Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight. *Journal of Biological Rhythms*, 28(4), 262–271.
- Forman, B. M., Chen, J., Blumberg, B., Kliewer, S. A., Henshaw, R., & Evans, R. M. (1994). Cross-talk among ROR $\alpha$ 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Molecular Endocrinology*, 8(9), 1253–1261.
- Fujieda, H., & Sasaki, H. (2008). Expression of brain-derived neurotrophic factor in cholinergic and dopaminergic amacrine cells in the rat retina and the effects of constant light rearing. *Experimental Eye Research*, 86(2), 335–343.
- Garbarino-Pico, E., Carpentieri, A. R., Contin, M. A., Keller Sarmiento, M. I., Brocco, M. A., Panzetta, P., Rosenstein, R. E., Caputto, B. L., & Guido, M. E. (2004). Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51172–51181.
- \*Gaston, K. J., Bennie, J., Davies, T. W., & Hopkins, J. (2013). The ecological impacts of nighttime light pollution: a mechanistic appraisal. *Biological Reviews*, 88(4), 912–927.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280, 1564–1569.
- Gooley, J. J., Rajaratnam, S. M., Brainard, G. C., Kronauer, R. E., Czeisler, C. A., & Lockley, S. W. (2010). Spectral responses of the human circadian system depend on the irradiance and duration of exposure to light. *Science Translational Medicine*, 2(31), 1–21.

- Guerrero-Vargas, N. N., Navarro-Espíndola, R., Guzmán-Ruíz, M. A., del Carmen Basualdo, M., Espitia-Bautista, E., López-Bago, A., Lascurain, R., Córdoba-Manilla, C., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2017). Circadian disruption promotes tumor growth by anabolic host metabolism; experimental evidence in a rat model. *BMC Cancer*, *17*(625), 1–13.
- Hafner, M., Koepl, H., & Gonze, D. (2012). Effect of network architecture on synchronization and entrainment properties of the circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus. *PLoS Computational Biology*, *8*(3).
- Hayashi, T. (1954). Effects of sodium glutamate on the nervous system. *The Keio Journal of Medicine*, *3*(4), 183–192.
- Hirano, T., Ishihara, K., & Hibi, M. (2000). Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, *19*, 2548–2556.
- Ikeno, T., & Nelson, R. J. (2015). Acute melatonin treatment alters dendritic morphology and circadian clock gene expression in the hippocampus of Siberian hamsters. *Hippocampus*, *25*(2), 142–148.
- Ikeno, T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2013). Photoperiod affects the diurnal rhythm of hippocampal neuronal morphology of siberian hamsters. *Chronobiology International*, *30*(9), 1089–1100.
- Jilg, A., Lesny, S., Peruzki, N., Schwegler, H., Selbach, O., Dehghani, F., & Stehle, J. H. (2010). Temporal dynamics of mouse hippocampal clock gene expression support memory processing. *Hippocampus*, *20*(3), 377–388.
- Kalsbeek, A., Garidou, M.-L., Palm, I. F., Van der Vliet, J., Simonneaux, V., Pévet, P., & Buijs, R. M. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *European Journal of Neuroscience*, *12*, 3146–3154.
- Kamphuis, W., Cailotto, C., Dijk, F., Bergen, A., & Buijs, R. M. (2005). Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *330*, 18–26.
- Kang, S. G., Yoon, H. K., Cho, C. H., Kwon, S., Kang, J., Park, Y.-M., Lee, E., Kim, L., & Lee, H.-J. (2016). Decrease in fMRI brain activation during working memory performed after sleeping under 10 lux light. *Scientific Reports*, *6*, 1–10.
- \*Kessels, H. W., & Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*, *61*(3), 340–350.
- King, D. P., Zhao, Y., Sangoram, A. M., Wilsbacher, L. D., Tanaka, M., Antoch, M. P.,

- Steeves, T. D. L., Vitaterna, M. H., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., Turek, F. W., & Takahashi, J. S. (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, *89*(4), 641–653.
- Kittrell, E. M. W., & Satinoff, E. (1986). Development of the circadian rhythm of body temperature in rats. *Physiology and Behavior*, *38*(1), 99–104.
- Klein, D. C., & Weller, J. L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: A circadian rhythm in N-Acetyltransferase. *Science*, *169*, 1093–1095.
- Kojima, D., Mori, S., Torii, M., Wada, A., Morishita, R., & Fukada, Y. (2011). UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS ONE*, *6*(10), 1–12.
- Korte, M., Carrollt, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenent, H., & Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*, 8856–8860.
- Kováčiková, Z., Sládek, M., Bendová, Z., Illnerová, H., & Sumová, A. (2006). Expression of clock and clock-driven genes in the rat suprachiasmatic nucleus during late fetal and early postnatal development. *Journal of Biological Rhythms*, *21*(2), 140–148.
- Krout, K. E., Kawano, J., Mettenleiter, T. C., & Loewy, A. D. (2002). CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience*, *110*(1), 73–92.
- Kubišťová, A. (2020). *Vliv stálého světla v rané ontogenezi na cirkadiánní systém v dospělosti.*
- Kubišťová, A., Spišská, V., Petrželková, L., Hrubcová, L., Moravcová, S., Maierová, L., & Bendová, Z. (2020). Constant light in critical postnatal days affects circadian rhythms in locomotion and gene expression in the suprachiasmatic nucleus, retina, and pineal gland later in life. *Biomedicines*, *8*(579), 1–20.
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell Press*, *98*, 193–205.
- Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H., & Kuhse, J. (1994). Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: Structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, *12*(6), 1291–1300.
- Landgraf, D., Achten, C., Dallmann, F., & Oster, H. (2015). Embryonic development and maternal regulation of murine circadian clock function. *Chronobiology International*, *32*(3), 416–427.

- Lavialle, M., Begue, A., Papillon, C., & Vilaplana, J. (2001). Modifications of retinal afferent activity induce changes in astroglial plasticity in the hamster circadian clock. *Glia*, *34*(2), 88–100.
- Leak, R. K., Card, J. P., & Moore, R. Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research*, *819*(1–2), 23–32.
- Lee, C., Etchegaray, J.-P., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I., & Reppert, S. M. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, *107*, 855–867.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, *25*(4), 402–408.
- Llamosas, M. M., Huerta, J. J., Cernuda-Cernuda, R., & García-Fernández, J. M. (2000). Ontogeny of a photic response in the retina and suprachiasmatic nucleus in the mouse. *Developmental Brain Research*, *120*(1), 1–6.
- \*Longcore, T., & Rich, C. (2004). Ecological light pollution. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *2*(4), 191–198.
- \*Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2011). Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms. *Advances in Genetics*, *74*, 175–230.
- Lu, B., & Gottschalk, W. (2000). Modulation of hippocampal synaptic transmission and plasticity by neurotrophins. *Progress in Brain Research*, *128*, 231–241.
- Lynch, H. J., Wurtman, R. J., Moskowitz, M. A., Archer, M. C., & Ho, M. . H. (1975). Daily Rhythm in Human Urinary Melatonin. *Science*, *187*, 169–171.
- Matějů, K., Sumovaná, A., & Bendová, Z. (2010). Expression and light sensitivity of clock genes *per1* and *per2* and immediate-early gene *c-fos* within the retina of early postnatal wistar rats. *The Journal of Comparative Neurology*, *518*(17), 3630–3644.
- Maywood, E. S., Reddy, A. B., Wong, G. K. Y., O’Neill, J. S., O’Brien, J. A., McMahon, D. G., Harmar, A. J., Okamura, H., & Hastings, M. H. (2006). Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Current Biology*, *16*, 599–605.
- Michel, S., Itri, J., Han, J. H., Gniotczynski, K., & Colwell, C. S. (2006). Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *BMC Neuroscience*, *7*(15), 1–11.
- Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., & Nabeshima, T. (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *The Journal of Neuroscience*, *20*(18), 7116–7121.

- Mollema, N. J., Yuan, Y., Jelcick, A. S., Sachs, A. J., von Alpen, D., Schorderet, D., Escher, P., & Haider, N. B. (2011). Nuclear receptor Rev-erb alpha (Nr1d1) functions in concert with Nr2e3 to regulate transcriptional networks in the retina. *PLoS ONE*, *6*(3), 1–10.
- Moore, R. Y., & Bernstein, M. ar. E. (1989). Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demoinstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. *The Journal of Neuroscience*, *9*(6), 2151–2162.
- Moore, R. Y., & Card, J. P. (1994). Intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *Journal of Comparative Neurology*, *344*(3), 403–430.
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, *42*, 201–206.
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*, *150*(1), 112–116.
- Moravcová, S., Červená, K., Pačesová, D., & Bendová, Z. (2016). Identification of STAT3 and STAT5 proteins in the rat suprachiasmatic nucleus and the Day/Night difference in astrocytic STAT3 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroscience Research*, *94*, 99–108.
- Moravcová, S., Pačesová, D., Melkes, B., Kyclerová, H., Spišská, V., Novotný, J., & Bendová, Z. (2018). The day/night difference in the circadian clock's response to acute lipopolysaccharide and the rhythmic Stat3 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *PloS ONE*, *13*(9), 1–16.
- Namgyal, D., Chandan, K., Sultan, A., Aftab, M., Ali, S., Mehta, R., El-Serehy, H. A., Al-Misned, F. A., & Sarwat, M. (2020). Dim light at night induced neurodegeneration and ameliorative effect of curcumin. *Cells*, *9*(2093), 1–21.
- Namihira, M., Honma, S., Abe, H., Masubuchi, S., Ikeda, M., & Honma, K. (2001). Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina. *NeuroReport*, *12*(3), 471–475.
- \*Navara, K. J., & Nelson, R. J. (2007). The dark side of light at night: Physiological, epidemiological, and ecological consequences. *Journal of Pineal Research*, *43*(3), 215–224.
- Noell, W. K., & Albrecht, R. (1971). Irreversible effects of visible light on the retina: Role of vitamin A. *Science*, *172*, 76–80.
- Ohta, H., Honma, S., Abe, H., & Honma, K. (2002). Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with



- developmental stage. *European Journal of Neuroscience*, 15(12), 1953–1960.
- Ohta, H., Mitchell, A. C., & McMahon, D. G. (2006). Constant light disrupts the developing mouse biological clock. *Pediatric Research*, 60(3), 304–308.
- Ohta, H., Yamazaki, S., & McMahon, D. G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Brief Communications*, 8(3), 267–269.
- Palma-Gómez, M., Osnaya, I., Balderas, A., Ortega, D., & Escobar, C. (2018). Constant light during lactation programs circadian and metabolic systems. *Chronobiology International*, 35(8), 1153–1167.
- \*Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383–400.
- Partch, C. L., Shields, K. F., Thompson, C. L., Selby, C. P., & Sancar, A. (2006). Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10467–10472.
- Pfeuty, B., Mato, G., Golomb, D., & Hansel, D. (2003). Electrical synapses and synchrony: the role of intrinsic currents. *The Journal of Neuroscience*, 23(15), 6280–6294.
- Pittendrigh, C. S., & Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology*, 106(3), 223–252.
- Pollock, G. S., Vernon, E., Forbes, M. E., Yan, Q., Ma, Y. T., Hsieh, T., Robichon, R., Frost, D. O., & Johnson, J. E. (2001). Effects of early visual experience and diurnal rhythms on BDNF mRNA and protein levels in the visual system, hippocampus, and cerebellum. *The Journal of Neuroscience*, 21(11), 3923–3931.
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110(2), 251–260.
- Provencio, I., Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., & Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *Journal of Neuroscience*, 20(2), 600–605.
- Rath, M. F., Rohde, K., Fahrenkrug, J., & Möller, M. (2013). Circadian clock components in the rat neocortex: daily dynamics, localization and regulation. *Brain Structure and Function*, 218(2), 551–562.
- Remé, C. E., Wirz-Justice, A., & Terman, M. (1991). The visual input stage of the

- mammalian circadian pacemaking system: I. Is there a clock in the mammalian eye? *Journal of Biological Rhythms*, 6(1), 5–29.
- Reppert, S. M., & Schwartz, W. J. (1986). Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *Journal of Neuroscience*, 6(9), 2724–2729.
- \*Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*, 647–676.
- Riva, M. A., Tascetta, F., Molteni, R., & Racagni, G. (1994). Regulation of NMDA receptor subunit mRNA expression in the rat brain during postnatal development. *Molecular Brain Research*, 25, 209–216.
- Roman, E., & Karlsson, O. (2013). Increased anxiety-like behavior but no cognitive impairments in adult rats exposed to constant light conditions during perinatal development. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 118(4), 222–227.
- Ruby, N. F., Fernandez, F., Garrett, A., Klima, J., Zhang, P., Sapolsky, R., & Heller, H. C. (2013). Spatial memory and long-term object recognition are impaired by circadian arrhythmia and restored by the GABA Antagonist pentylentetrazole. *PLoS ONE*, 8(8), 1–10.
- Ruby, N. F., Hwang, C. E., Wessells, C., Fernandez, F., Zhang, P., Sapolsky, R., & Heller, H. C. (2008). Hippocampal-dependent learning requires a functional circadian system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15593–15598.
- Rummel, C. (2016). Inflammatory transcription factors as activation markers and functional readouts in immune-to-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, 54, 1–14.
- Seney, M. L., Cahill, K., Enwright, J. F., Logan, R. W., Huo, Z., Zong, W., Tseng, G., & McClung, C. A. (2019). Diurnal rhythms in gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Nature Communications*, 10(1), 1–11.
- Shinohara, K., Funabashi, T., Mitushima, D., & Kimura, F. (2000). Effects of gab junction blocker on vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide rhythms in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroscience Research*, 38, 43–47.
- Smith, L., & Canal, M. M. (2009). Expression of circadian neuropeptides in the hypothalamus of adult mice is affected by postnatal light experience. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(11), 946–953.
- Stenvers, D. J., Van Dorp, R., Foppen, E., Mendoza, J., Opperhuizen, A.-L., Fliers, E., Bisschop, P. H., Meijer, J. H., Kalsbeek, A., & Deboer, T. (2016). Dim light at night

- disturbs the daily sleep-wake cycle in the rat. *Scientific Reports*, 6, 1–12.
- Sudo, M., Sasahara, K., Moriya, T., Akiyama, M., Hamada, T., & Shibata, S. (2003). Constant light housing attenuates circadian rhythms of the mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Neuroscience*, 121, 493–499.
- Sumova, A., Maywood, E. S., Selvage, D., Ebling, F. J. P., & Hastings, M. H. (1996). Serotonergic antagonists impair arousal-induced phase shifts of the circadian system of the Syrian hamster. *Brain Research*, 709, 88–96.
- Tosini, G., & Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Advancement Of Science*, 272, 419–421.
- \*Touitou, Y., Reinberg, A., & Touitou, D. (2017). Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life Sciences*, 173, 94–106.
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *PNAS*, 99(11), 7728–7733.
- Van den Pol, A. N., & Dudek, F. E. (1993). Cellular communication in the circadian clock, the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 56(4), 793–811.
- Vaněček, J., Pavlík, A., & Illnerová, H. (1987). Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Research*, 435, 359–362.
- Wang, L. M.-C., Dragich, J. M., Kudo, T., Odom, I. H., Welsh, D. K., O Dell, T. J., & Colwell, C. S. (2009). Expression of the circadian clock gene *Period2* in the hippocampus: possible implications for synaptic plasticity and learned behaviour. *ASN NEURO*, 1(3), 139–152.
- Wang, Y., Kuang, Z., Yu, X., Ruhn, K. A., Kubo, M., & Hooper, L. V. (2017). The intestinal microbiota regulates body composition through NFIL3 and the circadian clock. *Science*, 357, 912–916.
- Wardlaw, S. M., Phan, T. X., Saraf, A., Chen, X., & Storm, D. R. (2014). Genetic disruption of the core circadian clock impairs hippocampus-dependent memory. *Learning and Memory*, 21(9), 417–423.
- Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (1989). Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. *Developmental Brain Research*, 46(2), 291–296.
- Wood, B., Rea, M. S., Plitnick, B., & Figueiro, M. G. (2013). Light level and duration of exposure determine the impact of self-luminous tablets on melatonin suppression. *Applied Ergonomics*, 44(2), 237–240.

- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288, 682–685.
- Zucker, I., & Stephan, F. K. (1972). Circadian rhythms and drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 69, 1583–1586.

\* souhrnná práce